

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平7-502510

第3部門第2区分

(43) 公表日 平成7年(1995)3月16日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	
A 6 1 K 31/70		9454-4C		
48/00		8314-4C		
C 1 2 N 15/09		9050-4B	C 1 2 N 15/ 00	A

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 34 頁)

<p>(21) 出願番号 特願平5-511195</p> <p>(86) (22) 出願日 平成4年(1992)12月17日</p> <p>(85) 翻訳文提出日 平成6年(1994)6月17日</p> <p>(86) 国際出願番号 P C T / U S 9 2 / 1 1 0 0 4</p> <p>(87) 国際公開番号 W O 9 3 / 1 2 2 4 0</p> <p>(87) 国際公開日 平成5年(1993)6月24日</p> <p>(31) 優先権主張番号 8 0 9 , 2 9 1</p> <p>(32) 優先日 1991年12月17日</p> <p>(33) 優先権主張国 米国 (U S)</p> <p>(31) 優先権主張番号 8 9 4 , 4 9 8</p> <p>(32) 優先日 1992年6月4日</p> <p>(33) 優先権主張国 米国 (U S)</p>	<p>(71) 出願人 ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ ティ オブ カリフォルニア アメリカ合衆国 94612-3550 カリフォ ルニア州 オークランド トウェンティー セカンド フロア レイクサイド ドライ ブ 300</p> <p>(72) 発明者 デブス、ロバート ジェイ. アメリカ合衆国 94941 カリフォルニア 州 ミル バレー イートン ウェイ12</p> <p>(74) 代理人 弁理士 中島 淳 (外4名)</p>
---	--

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 囊胞性繊維症膜貫通型コンダクタンス調節活性 (C F T R) のための遺伝子治療

(57) 【要約】

気道細胞に外来遺伝子を発現できる哺乳動物の作製方法と組成物とが開示されている。脂質キャリアー核酸複合体又は核酸のみが調製され、エアロゾル又は全身的に経て、肺のみ又は肺及び肺外組織へ送達される。本発明は、肺及び関連する肺外組織における C F の症状発現の処置によって、肺の細胞を直接トランスフォームする方法を提供する。

請求の範囲

1. ヒト又は動物の体における疾患の処置又は治療方法に用いる組成物であって、該疾患は、野性型囊胞性繊維症膜貫通型コンダクタンス調節物質の不十分な内因性生成に関連し、該組成物は、医薬的に許容可能なキャリア若しくは希釈剤中に転写カセット若しくは発現カセットを含み、該転写カセット若しくは発現カセットは、野性型囊胞性繊維症膜貫通型コンダクタンス調節活性を有する分子をコードするオープンリーディングフレームの転写産物を、該転写カセット若しくは該発現カセットをトランスフェクトされた細胞中に、生成することができるDNA配列を含む、当該組成物。

2. 前記転写カセット又は発現カセットが陽イオン性脂質キャリアと会合する請求の範囲第1項記載の組成物。

3. 前記組成物が、前記転写カセット又は前記発現カセットと前記陽イオン性脂質キャリアとが会合した後に、噴霧化される請求の範囲第2項記載の組成物。

4. 前記トランスフェクトされる細胞が遠位気道細胞又は気道粘膜下組織細胞である請求の範囲第2又は3項記載の組成物。

5. 該細胞が気管の細胞である請求の範囲第2又は3項記載の組成物。

6. 前記細胞の20～100%がトランスフェクトされる請求の範囲第4又は5記載の組成物。

7. 前記DNA配列が誘導プロモーターを含む、請求の範囲第1又は2項記載の組成物。

8. 前記誘導プロモーターが、細胞特異性プロモーター、組織特異性プロモーター又はホルモン反応性プロモーターである、請求の範囲第1又は2項記載の組成物。

9. 前記細胞特異性プロモーター又は前記組織特異性プロモーターが囊胞性繊維症膜貫通型コンダクタンス調節物質遺伝子である請求の範囲第1、2又は8記載の組成物。

10. 前記DNA配列が、SV40エンハンサー要素を含み、これによって前記プロモーターによる転写が増強される請求の範囲第1、2、8又は9項記載の

組成物。

11. 前記陽イオン性脂質キャリアが、N-[1-2,3-ジオレイロキシ]プロピル]-N, N, N-トリエチルアンモニウム(DOTMA); ジメチルジ옥タデシルアンモニウムブロマイド(DDAB); 1, 2-ジオレイロキシ-3-(トリメチルアンモニオ)プロパン(DOTAP); リジニルホスファチジルエタノールアミン(L-PE); ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE); 及びコレステロール(Chol)からなる群より選ばれた脂質を含む請求の範囲第2乃至10のいずれか1項記載の組成物。

12. 前記陽イオン性脂質キャリアが、コレステロールと、N-[1-2,3-ジオレイロキシ]プロピル]-N, N, N-トリエチルアンモニウム(DOTMA); ジメチルジ옥タデシルアンモニウムブロマイド(DDAB); 1, 2-ジオレイロキシ-3-(トリメチルアンモニオ)プロパン(DOTAP); 及び、リジニルホスファチジルエタノールアミン(L-PE)からなる群より選ばれた脂質とを含む請求の範囲第2乃至10のいずれか1項記載の組成物。

13. 前記陽イオン性脂質キャリアが、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)と、N-[1-2,3-ジオレイロキシ]プロピル]-N, N, N-トリエチルアンモニウム(DOTMA); ジメチルジ옥タデシルアンモニウムブロマイド(DDAB); 1, 2-ジオレイロキシ-3-(トリメチルアンモニオ)プロパン(DOTAP); 及び、リジニルホスファチジルエタノールアミン(L-PE)からなる群より選ばれた脂質とを含む請求の範囲第2乃至10のいずれか1項記載の組成物。

14. 前記陽イオン性脂質キャリアが、小さな単ラメラ小胞である請求の範囲第2乃至10のいずれか1項記載の組成物。

15. 前記小さな単ラメラ小胞が、(a)ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)とN-[1-2,3-ジオレイロキシ]プロピル]-N, N, N-トリエチルアンモニウム(DOTMA)、又は(b)ジメチルジ옥タデシルアンモニウムブロマイド(DDAB)とコレステロール、を含む請求の範囲第14項記載の組成物。

16. 前記転写カセット若しくは発現カセットと前記陽イオン性脂質キャリア

が、約1:1から1:2の範囲のDNA(マイクログラム)対陽イオン性脂質(ナノモル)比で前記混合物中に存在する請求の範囲第2乃至10のいずれか1項記載の組成物。

17. 請求項2乃至16のいずれか1項記載の処置又は治療方法において使用されるキットであって、該キットは:

前記転写カセット若しくは発現カセットを含む容器;

特定量の陽イオン性脂質キャリアを含む別の容器; 及び、

取扱書

の組み合わせを含む当該キット。

18. 前記オープンリーディングフレームにイントロンが存在しない請求の範囲第1乃至16のいずれか1項記載の組成物。

19. 前記DNA配列が前記オープンリーディングフレームの5'側にイントロンを含む請求の範囲第1乃至16のいずれか1項記載の組成物。

20. 前記DNA配列が前記オープンリーディングフレームの3'側に広がるイントロンを含む請求の範囲第1乃至16のいずれか1項記載の組成物。

21. 前記処置又は治療方法が前記組成物の噴霧化後の口内又は鼻孔内投与である請求の範囲第1又は2項記載の組成物。

22. 前記処置又は治療方法が前記組成物の静脈内注入である請求の範囲第1又は2項記載の組成物。

23. 前記処置又は治療方法が前記組成物の噴霧化後の口内又は鼻孔内投与と該組成物の静脈注入との組み合わせである請求の範囲第1又は2項記載の組成物。

24. 前記囊胞性繊維症膜貫通型コンダクタンス調節物質(CFTR)遺伝子がヒト野性型遺伝子である請求の範囲第9項記載の組成物。

25. 前記オープンリーディングフレームが野性型ヒトCFTRの生物活性を有する分子をコードしている請求の範囲第1乃至24項のいずれか1項記載の組成物。

26. 前記オープンリーディングフレームが野性型ヒトCFTR遺伝子由来である請求の範囲第1乃至24項のいずれか1項記載の組成物。

27. 前記DNA配列がCFTR遺伝子以外の他の遺伝子由来の1以上のエン

ハンサー要素を含む請求の範囲第9又は24～28のいずれか1項記載の組成物。

28. 請求項2乃至27のいずれか1項記載の処置又は治療方法において使用されるキットであって、該キットは:

前記転写カセット若しくは発現カセットを含む容器;

特定量の陽イオン性脂質キャリアを含む別の容器; 及び、

取扱書

の組み合わせを含む当該キット。

囊胞性繊維症膜貫通型コンダクタンス調節活性 (CFTTR) のための遺伝子治療

序 論

技術分野

本発明は、囊胞性繊維症膜貫通型コンダクタンス調節活性を有する分子をコードする外来核酸を含むトランスジェニック（遺伝子導入）哺乳動物を作製するための方法及び組成物に関する。該核酸は、特に肺の気道及び肺胞への、エアロゾル化送達（デリバリー）によって又は全身性送達によって供給される。

背景

多くの遺伝子疾患が、特定タンパク質の欠失又は変異例えば該遺伝子内部の欠損によって生じる。ヒトにおいて最も一般的であり危険な遺伝子疾患のひとつは、囊胞性繊維症 (CF) である。囊胞性繊維症 (CF) は、外分泌腺機能不全の範囲のものであり、これは最終的には呼吸不全を引き起こし死ぬもので、囊胞性繊維症膜貫通型コンダクタンス調節物質 (CFTTR) 遺伝子の変異による。CFTTR 遺伝子は、正に染色体 7 q 31 に位置し、クローン化されている。アミノ酸位置 508 のフェニルアラニン残基の損失による 3bp の欠損が約 70% の CF 染色体に存在するが、正常染色体においては認められない。他の 30% の CF 変異は様々であり、欠損、ミスセンス及びスプライス部位変異が含まれる。更に単一の正常な CFTTR 遺伝子のコピーのトランスフェクションは、CF 細胞株における CF 分泌の欠陥を廃止し、これは CF のための遺伝子治療の可能性を支持する。これらの結果は、野生型 CFTTR 注入遺伝子 (transgene) の発現が、内因性変異体 CFTTR 遺伝子を同時に発現している CF 細胞において、優性に正の効果を発揮することができることを証明する。従って、CF 患者の肺中の野生型 CFTTR 注入遺伝子の発現は、CF 表現型を正すことができる。しかし、現在までにエアロゾル又は静脈 (i.v.) 投与による肺での注入遺伝子の高レベル発現の真

くつかの戦略が、リポソーム媒介物送達の効率を、特定の組織及び特定の細胞型にリポソームを向けることによって上げることを提案している。しかし、リポソーム媒介ベクターの使用のための基本的な方法論が十分に開発されている一方で、この技術が *in vivo* 遺伝子治療におけるリポソーム主体トランスフェクションベクターについて完成していない。今日までに確立されている研究ではベクターの静脈内投与、気管内投与又は特定組織への注入は、低いが証明可能な発現をもたらすが、この発現は、一般にひとつの組織、普通は注入された組織（例えば筋肉）か：静脈注入が用いられた場合の肝臓若しくは肺か；気管内注入が用いられた場合の肺かに限定され、これらの組織内の全細胞の 1% 未満がトランスフェクトされた。

注入遺伝子の *in vivo* 発現は、注入遺伝子の特定組織への直接的な注入、例えば裸の DNA 又は DNA-陽イオン性リポソーム複合体の直接的気管内、筋肉内若しくは動脈内注入に、又は宿主細胞の *ex vivo* トランスフェクション及びその後の再注入に拘束されていた。近年有効な遺伝子送達戦略は、一様に、*in vivo* における高レベル及び／又は広汎性の注入遺伝子発現の生成に失敗していた。陽イオン性ベクター及びアデノウイルスベクター中にパッケージングされたいずれかの導入遺伝子の発現は、気管内 (IT) 点滴後にげっ歯類の肺において証明された。しかし、IT 注入は慢性的であり、点滴物の不均一な分布をもたらす；また、ヒトにおいて繰り返し実施するには侵襲性過ぎる。欠陥が肺中での主要な生命危機の欠陥である CF 患者にとって、非侵襲性送達技術の開発は興味を引くものであり、またこれは他の方法で行うよりも、肺への外来核酸コンストラクトのより深い侵入をもたらす。CFTTR 遺伝子コンストラクトを、気道上皮細胞及び気道粘膜下細胞型の両方をトランスフェクトすると同様に、遠位気道に亘って沈着するために用いられることができる。CF 患者における他の器官が変異体 CFTTR 遺伝子の存在のために作用される場合、広い範囲の組織のトランスフォーメーションの技術は、CF 患者における肺臓外器官不全を軽減するために興味あるものとなる。

関連文献

特表平 7-502510 (3)

現の不能が、CF の治療のための遺伝子治療の使用を妨げている。CF 患者からの細胞における野生型 CFTTR 注入遺伝子の発現は、CF の初期生化学的障害である塩素分泌欠陥を正す。塩素分泌は変異体 CFTTR タンパク質の存在にも拘らず、CF 患者の細胞において正常化され、これは、野生型及び変異体 CFTTR タンパク質が細胞中で共に発現している場合に野生型 CFTTR が優性であることを示す。

これまで、ヒト患者における欠失又は変異した遺伝子を置換する試みは、*ex vivo* (体外的) 技術に依存してきた。*ex vivo* 技術には、裸の DNA 又はリポソームに被包された DNA によって *in vitro* で細胞をトランスフォーメーションして、その後好適宿主器官に導入すること ("*ex vivo*" 遺伝子治療) が含まれるが、これに限らない。好適宿主器官の基準は、移植標的器官が問題の疾患の部位であること、疾患がわかりやすいこと、*in vitro* で操作可能であること、遺伝子改変方法が行いやすいことであり、また非複製細胞又はサイクリング (細胞周期をまわっている) 幹細胞を含む遺伝子修正を永続できることが理想的である。また、遺伝的に改変された細胞を機能的且つ安定した形で生体に再移植可能なことも必要である。*ex vivo* 遺伝子治療の要件は、この他に、例えばレトロウィルスベクターを用いる場合、細胞が有糸分裂前であることである；有糸分裂後の細胞は、レトロウィルスベクターによる感染に無反応性である。*ex vivo* 治療には幾つかの欠点がある。例えば、分化し、複製中の細胞のみが感染すると、新たに導入された遺伝子機能は、その細胞が成熟して死滅すれば失われてしまう。*ex vivo* 的手段は、また限られた数の細胞のトランスフェクションにしか利用できず、生体から最初に取り出されたものでない細胞をトランスフェクションには利用できない。*in vivo* (体内的) 遺伝子移入の基準に合った標的器官の例は哺乳動物の骨髄であり；哺乳動物の肺は、*ex vivo* 治療のための良い候補ではない。

動物モデルの研究では、遺伝子移入の効率を高めるために、レトロウィルス、アデノウィルス及びリポソームが用いられてきた。リポソームは、薬物、放射線治療薬、酵素、ウィルス、転写因子及び他の細胞性エフェクターを種々の培養細胞株及び動物へ効率的に導入するために用いられている。更に、リポソーム媒介物送達の効率を試験するための好結果をもたらす臨床実験が完成している。い

欧州特許出願第 91301810.8 号 (公告番号第 0446017A1 号) には、囊胞性繊維症膜貫通型コンダクタンス調節物質 (CFTTR) タンパク質をコードする完全単離 DNA 及びその種々の変異体が開示されている。トランスフォームされた培養 COS-7 細胞における CFTTR の一過性発現もまた開示されている。リック (Ric h) ら、Nature (1990) 347:358-363 及びグレゴリー (Gregory) ら、Nature (1990) 347:382-386 には、ワクシニアウィルスベクターを用いた培養 H e L a 細胞における囊胞性繊維症膜貫通型コンダクタンス調節遺伝子の発現が開示されている。ヨシムラらは、裸の DNA 及びリポベクターに複合された DNA として CFTTR 遺伝子を含むプラスミドの気管内投与後におけるマウス肺における該遺伝子の発現を開示している。

ブリガム (Brighem) ら、Am. J. Med. Sci. (1989) 298:278-281 は、リポソームビヒクルを用いた CAT 遺伝子によるマウス肺の *in vivo* トランスフェクションについて開示している。トランスフェクションは、静脈内、気管内又は腹腔内注入によって実施された。静脈内及び気管内投与は共に、肺における CAT 遺伝子の発現をもたらした。しかし、腹腔内投与はもたらさなかった。ウェルザー (Werth ers)、Clinical Research (1991) 39: (抄録) も参照のこと。

カノニコ (Canonic) ら、Clin. Res. (1991) 39:219A は、培養ウシ肺上皮細胞において CMV プロモーターによる ヒト α -1 抗トリプシン遺伝子の発現を記述している。該遺伝子は、陽イオン性リポソームを使って培養中の細胞に添加した。この実験では、リポソームに複合された遺伝子コンストラクトの静脈内送達後に、ニュージーランド白ウサギの肺の組織学検査用切片に α -1 抗トリプシンの存在が認められた。ヨシムラらは、気管内プラスミド媒介遺伝子移入後のマウス肺における、ヒト囊胞性繊維症膜貫通型コンダクタンス調節物質遺伝子の発現を開示している。

機能的な新規遺伝物質の細胞への導入のための複数の手段は、*in vitro* 及び *in vivo* の両方で試みられた (フリードマン (Friedmann)、(1989) Science, 244:1275-1280)。これらの手段には、改変レトロウィルスへの発現すべき遺伝子の組み込み：ローゼンバーグ (Rosenberg) (1991) Cancer Research 51(18)、追補：5074S-5076S)；非レトロウィルスベクターへの組み込み (ローゼンフェルド (Rosen

feld)ら、(1992) Cell, 68:143-155; ローゼンフェルドら、(1991) Science, 252:431-434; 又は、リボソームを経た異種プロモーター・エンハンサー成分に連結された注入遺伝子の送達 (フリードマン、(1989)、前出; プリガムら、(1989) Am. J. Med. Sci., 298:278-281; ナーベル(Nabel)ら、(1990) Science, 249:1285-1288; ハジンスキ(Hazinski)ら、(1991) Am. J. Resp. Cell Molec. Biol., 4:206-209; ワンとハン(Huang)、(1987)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 84:7815-7855; リガンド特異性、陽イオン主体輸送システムとの結合 (ウー(Wu)及びウー、(1988) J. Biol. Chem., 263:14621-14624)又は標的DNA発現ベクターの使用 (ナーベルら、(1990)、前出; ウォルフ(Wolff)ら、(1990) Science, 247:1465-1468)が含まれる。注入遺伝子の組織への直接注入は、局所的な発現のみをもたらす (ローゼンフェルド、(1992)前出); ローゼンフェルドら、(1991)、前出; プリガムら (1989)、前出; ナーベル、(1990)、前出; 及びハザンスキら、(1991)、前出)。プリガムらのグループ(Am. J. Med. Sci. (1989) 298:278-281 及び Clinical Research (1991) 39 (抄録))は、DNAリボソーム複合体の静脈内又は気管内投与の後のマウスの肺のin vivo トランスフェクションのみを報告している。ヒト遺伝子治療手法の総説記事の例は: アンダーソン(Anderson)、Science (1992) 256:808-813がある。

PCT/US90/01515(フェルナー(Felner)ら)は、in vivo での脊椎動物の細胞の内部への医薬的又は免疫源的ポリペプチドをコードする遺伝子の送達の方法に向けられている。注入遺伝子の発現は、注入組織に限定されている。PCT/US90/05693(プリガム)は、発現コンストラクトの静脈内又は気管内注入の後の哺乳動物肺細胞における注入遺伝子の発現を得るための方法に向けられている。PCT/89/02469 及びPCT/90/06997 は、ex vivo 遺伝子治療に向けられ、これは、体内から取り出すことができる細胞例えばリンパ球における注入遺伝子の発現に限定されている。PCT89/12109 は、同様にex vivo 遺伝子治療に向けられている。PCT90/12878 は、トランスフォームした細胞株及びex vivo トランスフォーメーションを用いたトランスジェニックマウスの両方における高レベルな発現を提供する。

デブス(Debs)らは、エアロゾル化及びリボソーム中での送達による肺へのペン

タミジン取込みを開示している。Am. Rev. Respir. Dis (1987) 135:731-737参照。核酸の送達のためのキャリアとしてのリボソームの使用に関する概説のために、ハグ(Hug)及びスライト(Sleight)、Biochim. Biophys. Acta. (1991) 1097:1-17; ストロビンガー(Straubinger)ら、Methods of Enzymology (1993), 101巻、512-527 を参照のこと。

概要

肺細胞に、野性型囊胞性繊維症変異型コンダクタンズ調節物質 (CFTR) の生物学的活性を有する分子をコードする外来核酸を含む哺乳動物を生成するための方法及び組成物が提供される。該核酸は、DNAのセンス又はアンチセンス順のいずれかであり得る。また、CFTR核酸を含むトランスジェニック哺乳動物も提供される。該方法は、コンストラクトと宿主細胞とをin vivo で接触するステップを含み、これは、該コンストラクトによって接触される細胞をトランスフォームするために十分な量で該核酸を含む。外来核酸は、一般に、転写カセット又は発現カセットの形で提供され、哺乳動物において機能的な調節配列と操作可能に結合されたCFTR分子のコード配列を含む。該方法及び組成物は、特に囊胞性繊維症のin vivo 遺伝子治療に使用される。

図面の簡単な説明

図1は、対照マウス (図1B及び1D) と、DDAB:コレステロール (以下、Chol) (1:1) リボソームと複合されたヒトCFTR遺伝子 (pZN32) を含むプラスミドで処理されたマウス (図1A、1C及び1E) との肺の凍結切片の顕微鏡写真を示す。図1A、1C及び1Eは、各々、50倍、100倍及び250倍での処理マウスの肺切片である。図1B及び1Dは、倍率50×及び100×の未処理 (対照) マウスからの肺切片である。脂質キャリアは、1対1モルのDDAB:Chol (SUV) であった。脂質キャリア-DNA複合体は、1μgにDNAに対して5nmolの陽イオン性脂質であった。

図2Aは、pZN27:DDAB:Chol発現ベクター-陽イオン性脂質キャリア複合体の静脈注入後48時間のマウス肺の切片を示す。脂質キャリア組成物は、1:1モルのDDAB:Cholであった。脂質キャリアプラスミド率は、

1μgのDNAに対して5nmolの陽イオン性脂質であった。100μgのDNA投与量で、マウス毎に注入された。この視野は、肺胞及び肺動脈壁細胞を示し、この大部分 (50~70%) が、抗CAT抗体をプローブとしてアルカリホスファターゼを用いて検出された場合に、CATタンパク質の存在に対して陽性に染色している。処理動物の肺は、肺胞及び血管内皮細胞を包含して均一に染色されている。気道上皮染色は、気道もトランスフェクトされることを示している。CAT (クロロムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ) タンパク質は、普通、哺乳類細胞には存在せず、従って、これらの細胞中のCATタンパク質の存在は、これらがin vivo でトランスフェクトされたことを示している。図2Bは、静脈注入脂質キャリアのみで処理され、抗CAT抗体をプローブとして用いた対照動物からのマウス肺の切片を示している。細胞は、顕著な染色を示さず、低レベルのバックグラウンド染色がいくらか肺動脈マクロファージにおいて検出可能であり、これは内因性のアルカリホスファターゼ活性を有する。

図3は、pZN20のコンストラクションを示している。

図4は、細胞表面リセプターに結合した後の、陽イオン性脂質キャリア:DNA複合体 (DOTMA:DOPE:pRSV-CAT) が伝統的なリセプター仲介エンドサイトシスを経て細胞に取り込まれたことを証明する電子顕微鏡写真を示している。脂質キャリアは1:1のDOTMA:DOPEであった。20μgのDNAは20nmolの陽イオン性脂質と複合された。

図5は、pZN20:DDAB:DOPE複合体の静脈注入後の表示組織内におけるCAT遺伝子発現を示している。脂質キャリアは、DDAB:DOPEが1対1モルであった。2つの脂質キャリア対プラスミド比 (nmol陽イオン性脂質μgプラスミドDNA) が用いられ、MLVは6:1、及びSUVは3:1であった。レーン1~6は肺組織; レーン7~12は心臓組織; レーン13~18は肝臓; レーン19~24は腎臓; レーン25~30は脾臓; レーン31~36はリンパ節からの試料である。各組織セットの最初の3つは、MLVと共に注入された動物からのものであり、各組織の次の3つはSUVと共に注入された動物からのものであった。レーン1~18では、クロマトグラフィーを下部から上部へ向かって流し、レーン19~36はクロマトグラフィーを上部から下部へ向かって

流した。これら結果は、pZN20:DDAB:DOPE複合体の静脈注入が6つの異なる組織において有意なレベルのCAT遺伝子発現をもたらすことを証明している。更に、MLVは同一脂質から構成されたSUVの場合と等しい又はより大きいレベルのin vivo 遺伝子発現を仲介するようである。

図6は、pSIS-CATプラスミドに複合されたDOTMA:DOPEの静脈注入の結果がin vivo での検出可能なCAT発現をもたらさないことを示している。図6Aは脂質キャリアのみ (レーン1~4) 又は脂質キャリア+DNA (レーン5~8) を用いた静脈注入後2日の肺、脾臓、肝臓及び心臓の解析を示している; 図6Bは、マウス肺、脾臓、肝臓及び心臓での6日目の結果を示している (脂質キャリアはDOTMA:DOPE 1:1モルであった)。陽イオン性脂質対DNA比は、1μgに対して4nmolであった。100μg DNAがマウスに対して注入された。両方の図において、クロマトグラフィーは下部から上部へ向かって流れている。

図7はプラスミドpZN27のコンストラクションを示している。

図8は、pZN27のみ又はpZN27:DDAB:Chol SUV複合体を用いて静脈内注入後の指示された組織におけるCAT遺伝子発現を示している。図8Aのレーン1~10は肺; レーン11~20は心臓; レーン21~30は肝臓; レーン31~40は腎臓; 図8Bのレーン1~10は脾臓; レーン11~20はリンパ節である。10の各組織セットは、順に下記のもので処理された試料を含む: 2試料、500μg DNA; 2試料、1mg DNA; 2試料、2mg DNA; 2試料、500μg DNA 2回; 2試料、脂質キャリア-DNA複合体100μg DNA。図8Aでは、レーン1~20は下部から上部へクロマトグラフィーを流している; 図8Aレーン21~40ではクロマトグラフィーを上部から下部へ流している。図8Bレーン1~20では、クロマトグラフィーを下部から上部へ流している。脂質キャリアは1対1モルDDAB:Cholとした。脂質キャリア-DNA複合体は1μg DNAに対して5nmol陽イオン性脂質であった。

図9は、pRSV-CAT:DOPE:CEBA複合体の静脈注入後の肺におけるCAT発現を示している。レーン1~3は、未処理マウス肺からの試料であ

り、レーン4は脂質キャリアのみで処理したマウスからの肺試料のものであり、レーン5は脂質キャリア-DNA複合体で処理したマウスからの試料である。脂質キャリアは1対1モル比PE:CEBAであった。脂質キャリア-DNA複合体は、1 μ g DNAに対して1nmolの陽イオン性脂質であった。100 μ g DNAをマウス毎に注入した。クロマトグラフィーは図において示されるように下部から上部へ流している。

図10は、プラスミドpZN32のコンストラクションを示している。

図11は、プラスミドpZN51のコンストラクションを示している。

図12は、プラスミドpZN60、pZN61、pZN62及びpZN63のコンストラクションを示している。図12Aは、中間体プラスミドpZN52、pZN54、pZN56及びpZN58のコンストラクションを示している。図12Bは、中間体からの最終プラスミドpZN60～pZN63のコンストラクションを示している。

図13は、マウスにおける静脈的に注入した6の異なるプラスミドに対するCATアッセイの薄層クロマトグラフィーのオートラジオグラフィを示している。レーン1～12は、肺組織におけるCAT活性を示し；レーン13～24は肝組織におけるCAT活性を示している。レーン1、2、13、14はpZN51であり；レーン3、4、15、16はpZN60であり；レーン5、6、17、18はpZN61であり；レーン7、8、19、20はpZN62であり；レーン9、10、21、22はpZN63であり；レーン11、12、23、24はpZN27である。脂質キャリアはDDAB:Chol(1:1)であった。脂質キャリア-DNA複合体は、1 μ g DNAに対して5nmol陽イオン性脂質であった。100 μ g DNAをマウス毎に注入した。各レーンは単一マウスを表す。クロマトグラフィーは示される図の下部から上部へ流れている。

図14(A-F)は、未注入マウス(レーン1～3)、pBE3.8CAT(レーン4～6)又はpCIS-CAT(レーン7～9)を有する静脈内注入されたマウスからの心臓(14A)、脾臓(14B)、肺(14C)、リンパ節(14D)、腎臓(14E)及び肺の内層(14F)におけるCAT活性を示している。

するために作られた拘束器に人れた後に小型改良マウスケージ内でエアロゾルに曝露したマウスで得られた結果である。

図22は、DOTMA:DOPE リポソーム24 μ molに複合されたpCIS-CATプラスミド12mgを含有するエアロゾルを受けた72時間後に犠牲死させられたマウス(A、B、C、D)、及び未処置マウス(E、F)からの肺切片における細胞内CATタンパク質に免疫染色した結果である。Dに示した切片は、抗CAT抗体の代わりに正常ウサギ血清で処理したものを示した。倍率は、A、Dが50倍、B、C、Eが250倍である。

図23は、CMV-CATプラスミドのみ12mg、又はDOTMA:DOPE(1:1)リポソーム24 μ molに複合されたCMV-CATプラスミド12mgを含有するエアロゾルを受けた72時間後に犠牲死させたマウスからの肺抽出物におけるCAT活性を示している。未処置マウスもアッセイした。

図24は、(A)DOTMA:DOPE リポソーム24 μ molに複合されたpCIS-CATプラスミド12mgを含有するエアロゾルを受けた1～2日後に犠牲死させたマウスの肺抽出物におけるCAT活性；及び(B)マウスからのいくつかの異なる組織抽出物CAT活性を示しており、注入遺伝子の発現が、図24Aにおいて、3日目に犠牲死にされた正常マウスへのDNA-リポソーム複合体のエアロゾル投与後に肺に特異的であることを示唆している。対照抽出物は、精製CAT酵素を含む。

図25は、DOTMA:DOPE リポソーム24 μ molに複合されたpCIS-CATプラスミド12mgを含有するエアロゾルを受けた直後に犠牲死させたマウスの肺から(レーン1～4、レーン6～9)、及び対照の未処置マウス(レーン5)から得られたゲノムDNAのザンブロットハイブリダイゼーションを示す。試料を制限酵素HindIIIで消化し、1.8kbのCATフラグメントをプローブとした(上図)。同じメンブレンを、マウス因子vii1、Aゲノムクローンから得た1.1kbのBSU36-1単一コピーをプローブに用いてハイブリダイズさせた(下図)。

図26(A-F)はCMV-CAT(図21A及び21D)、CFTR-CAT(図21B及び21D)並びに対照動物(図21C及び21E)で注入された

図15は、pZN13のコンストラクションを示している。

図16は、pZN29のコンストラクションを示している。

図17は、pZN32のコンストラクションを示している。

図19は、図19AではHCMV(Towne)及び図19CではHCMV(AD169)の、前初期エンハンサー及びプロモーター領域のHCMV(Towne)の完全制限地図を示している。図19Bは、2つのHCMVプロモーターの配列比較を示している。Towne株の配列は、この比較においてhs5mi1として表されている。NcoI部位はアスタリスクで表示されている。

図20は、pRSV-CAT-DOTMA:コレステロール複合体のエアロゾル投与がマウス肺にCAT遺伝子の発現をもたらしたことを示す。レーン1～3は未処置マウス、レーン4～6は0.5mgのpRSV-CATと1.0 μ mol DOTMA-コレステロール・リポソーム投与のマウス、レーン7～9は2.0mgのpRSV-CATのみ投与のマウス；及び、レーン10～12は2.0mgのpRSV-CATと4.0 μ molのDOTMA-コレステロール・リポソームをモル比2:1で投与したマウスから得られた結果であった。CAT遺伝子は、通常は哺乳動物の細胞には存在しない；従って、この結果から、pRSV-CAT-DOTMA-コレステロール:リポソーム・エアロゾルにより肺がうまくトランスフェクションされたことがわかる。また、pRSV-CAT単独エアロゾル投与も、より低いエアロゾル投与量のpRSV-CAT:DOTMA-コレステロール複合体も、マウス肺に検出可能なCAT遺伝子の発現がもたされなかったを示している。従って、陽イオン性リポソームキャリア、及び十分な投与量のDOTMA:リポソーム複合体の両方が、エアロゾル投与後に肺で注入遺伝子の発現をもたらすために必要であり、リポソームとDNAとを好適な比で且つ好適な割合で与えた場合に、注入遺伝子発現が最大となる。

図21は、DOTMA/DOPE1:1リポソーム24 μ molに複合させた12mgのpCIS-CATをマウスに投与した実験の結果を示す。レーン1～3はイントックス設計の鼻エアロゾルチャンバ中でエアロゾルを投与したマウスの結果を示し；レーン4～7は改良型のマウスケージ内でエアロゾルに曝露したマウスからのものであり、レーン8～10はもともとイントックスチャンバで使用

マウスの肺におけるCAT活性の組織学解析を示している。

特定具体例の説明

本発明によると、核酸コンストラクトとその調製及び使用方法とが提供される。これは、十分な投与量の脂質キャリア-核酸エアロゾルを宿主哺乳動物に送達して又は裸の若しくは脂質キャリアと複合した十分な投与量の核酸を全身性送達して宿主肺細胞のトランスフェクションを行った後、宿主哺乳動物の気管中の細胞の表現型及び/又は遺伝子型をin vivoで修正可能にするものである。核酸は野性型CFTRの生物活性を有する分子をコードするヌクレオチド配列であり、転写された場合に、内因性CFTR遺伝子時に変異体CFTR遺伝子の発現を遮断するために十分な量及びサイズの正常転写産物に相補的なmRNAを精製する配列である。肺気道細胞における野性型CFTRとCF患者で機能不全である肺臓外細胞との発現が特に対象となる。従って、ここで用いられる「核酸」とは、CFTR活性を有する分子をコードするセンス又はアンチセンス鎖を指す。脂質キャリア-核酸エアロゾルは、脂質キャリア-核酸複合体の凝集を最小限に抑える生物学的に適合可能な液体で調製した脂質キャリア-核酸試料混合物を噴霧することによって得られる。この方法及び組成物を、肺組織、特に肺胞及び気道細胞に、また非肺臓組織における適当な外分泌細胞型に、CFTR活性を有する分子をコードする外来核酸を含有する哺乳動物を複製するために用いることができる。

本発明の中心は、肺細胞をエアロゾル投与又は全身性投与を経てトランスフェクションすることができることを発見した点である。この発明では、高投与量の裸の核酸を使用することもできる一方で、送達機構として脂質キャリアを使用する利点がある。脂質キャリアは、得られる複合体が噴霧化されて注入され得る若しくは噴霧装置を使用して、特定の肺組織へ送達され得るように、電荷のやりとりを通じて安定的に結合することができる。脂質キャリアには、リポソーム及びミセルがあり、また修飾されたホスホグリセリド、特にアルカリホスホグリセリドを含む生分解性陽イオン化合物が含まれるが、これらに限定されるものではない。

脂質キャリア、特にリポソームは、とりわけ薬物、放射線治療剤、酵素、ウィ

ルス、転写因子及びその他の細胞性エフェクターを様々な培養細胞株及び動物に導入することに効果的に用いられている。更に、細胞外で作用する小分子及びペプチドのリボソームが伸介送達の有効性を調べる臨床治験の好ましい成績も報告されている。しかし、リボソーム伸介ベクターを用いた基本的な方法は十分開発され、安全であることも明らかになってはいないが、変異体C F T R遺伝子に関連する遺伝子疾患のin vivo 遺伝子治療のために、肺組織及び特定の肺臓外組織への核酸の送達のための技術は、これまでのところまだ開発されていない。in vivo 遺伝子治療とは、変異体若しくは欠損C F T R遺伝子及び遺伝子産物に関する疾患の予防、軽減及び／又は治療のための外来核酸の転写及び／又は翻訳を意味する。

脂質キャリアー核酸コンストラクト含有液のエアロゾル化送達又は全身性送達後に肺細胞のトランスフォーメーションをもたらしたり、高レベルの発現を達成するための特定の脂質キャリアー核酸複合体の相対的能力に影響を及ぼしうる要因も幾つか確認されてきている。エアロゾル化送達のために、これらの要因としては、(1) 噴霧前又は噴霧中に大(マクロ)凝集体を生じず、従って核酸がせん断によってフラグメントにならないような溶液の調製、並びに(2) 脂質キャリアー核酸複合体のエアロゾル化及び宿主動物への投与の後に、宿主肺細胞で予想されるトランスフォーメーションをもたらす発現コンストラクトと脂質キャリアーとの両方の調製が含まれる。その他の要因としては、溶液調製に使用する希釈液並びに、エアロゾル化若しくは全身性送達のために噴霧するための溶液中の脂質キャリアー：核酸比がある。

核酸-脂質キャリアー複合体のエアロゾル化送達は、他の投与方法に比べて多くの利点がある。例えば、エアロゾル投与は、宿主に対する毒性を減らすのに役立つことができる。ペンタミジンやサイトカインなどの物質の送達でこうした効果が認められている。これらの物質は全身投与するときわめて毒性が高くなり得るが、エアロゾル化すると寛容性がよい。例えば、デブスラ、Antimicrob. Agents Chemother. (1987) 31:37-41 ; デブスラ、Amer. Rev. Respir. Dis (1987) 135:731-737 ; デブスラ、J. Immunol. (1988) 140:3482-3488 ; モンゴメリー(Montgomery)ら、Lancet (1987) 11:480-483 ; モンゴメリーら、Chest (1988) 95:747-751 ; ル

含まれる。更に、どのex vivo 方法でも、体から取り出した細胞を一定時間培養して維持する必要がある。培養中に、細胞が有害な或いは潜在的に危険な表現型及び／又は遺伝型の変化を起こし得る。アデノウイルス及び他のDNAウイルスベクターも、上記の潜在的な危険の幾つかを共有する。特にヒトで使用するには、また獣医学でも回復使用するときには、非感染性、非免疫原性及び非変異原性であり、且つ、宿主にとって無毒性である及び／又は容易に排泄される天然化合物にまで宿主哺乳動物によって代謝又は排泄される生分解可能な、脂質キャリアーが使用され得る。

本発明で使用するコンストラクトには、当該コンストラクトの用途に応じていくつかの形がある。従って、コンストラクトにはベクター、転写カセット、発現カセット及びプラスミドが含まれる。好ましくは、転写及び翻訳開始領域(時として“プロモーター”とも呼ばれる)は、転写開始調節領域と翻訳されない5'側配列の翻訳開始調節領域即ちリボソームへのmRNAの結合及び翻訳開始に寄与する“リボソーム結合部位”が入っていることが望ましい。開始調節領域の転写及び翻訳機能要素は、同一の遺伝子から由来又はこれから入手可能であることが望ましい。ある具体例では、プロモーターはエンハンサーなどの配列の追加、又は必須でない及び／又は望ましくない配列の削除によって改変される。“入手可能”とは、対象DNAの転写の所望な特異性を提供するために、本来のプロモーターと類似しているDNA配列を有するプロモーターを意図している。これには、天然配列と合成配列、更には合成配列と天然配列の組合せによる配列が含まれる。

核酸コンストラクトは一般に転写カセットとして提供される。イントロンはこのコンストラクトに任意的に含まれ得、好ましくは ≥ 100 bpでありコーディング領域の5'側に配置される。一般に、コンストラクトは宿主細胞ゲノムへ組み込まれず、コンストラクトは非組み込み発現カセットの一部として宿主へ導入されることが好ましい。コーディング領域は、DNAポリメラーゼがプロモーター配列に結合し、センス鎖又はアンチセンス鎖において、mRNAへコーディング配列を転写する際に、細胞内の転写調節領域に“操作可能に連結される”か、若しくは“その制御下にある”。従って、該核酸配列は、治療効果に直接又は間接

に作用する。N. Eng. J. Med. (1990) 323:769-775を参照。更に、肝臓及び脾臓の網内系による循環リボソームの急速なクリアランスも回避されるので、対象部位即ち肺に投与した物質が存在し続けることができる。治療薬の血清清浄導不活化も減少する。この肺細胞トランスフェクション方法では、宿主哺乳動物の性腺への曝露が避けられるので、生殖系細胞のトランスフェクションを防げる。

本発明のその他の利点には、投与が容易であることが含まれ、宿主哺乳動物は、エアロゾル化された脂質キャリアー核酸溶液を目的の組織即ち肺に向けて吸入するだけでよい。更に、噴霧される粒子の大きさを変えることによって、エアロゾルを肺のどこまで送達するかある程度制御することができる。送達は長期間に延長され得る。従って、標的細胞が発現コンストラクトに曝露される時間が有意に増加される。エアロゾルの分布領域は、スプレーが到達しうる肺の全領域にまで及ぶ。これらの利点は、気管内送達のような他の投与経路と比較すると特に意義のあるものである。気管内投与は侵襲性であり、核酸発現コンストラクトは大きな塊となって送達されて、粘膜障害を損傷し得、その上、導入された液が肺のより低い領域に貯留してしまうこともある。気管内チューブの挿入による損傷は、トランスフェクトされるべき発現コンストラクトに接触する細胞の能力を変化し得る。

本出願に用いられているベクターのタイプも、他の有効なシステムにおける利点となる。例えば、大部分の遺伝子治療戦略は、レトロウィルス又はDNAウィルスのベクターへの注入遺伝子挿入に依存してきた。脂質キャリアーの利用と比較した場合のレトロウィルスベクターの潜在的欠点には、(ex vivo とは逆に) in vivo の注入遺伝子発現を伸介するレトロウィルスの能力限界；レトロウィルスは非分裂細胞をトランスフェクトすることができないこと；複製欠損レトロウィルスベクターにおける組換え現象の可能性、これは、感染レトロウィルスを生じる；宿主細胞ゲノムDNAへの注入遺伝子のランダム挿入による遺伝子発現の活性化又は腫瘍抑制遺伝子の阻害可能性；大きさの制限(レトロウィルスベクターにパッケージングできるのは15 kb未満のDNAであるが、脂質キャリアーは250 kb以上のDNA配列を哺乳動物細胞に送達するために用いることができる)；並びに、ベクターに対する宿主の免疫応答を誘発する慣用ベクターの潜在的な免疫原性が

的に寄生するC F T Rの生物活性を有するポリペプチドをコードするDNA配列と、ヌクレオチド配列例えばアンチセンス配列及びリボザイムをコードするヌクレオチド配列と、を含む。

ある場合には、高レベルでの宿主細胞ゲノムDNAへの組み込みによって又は安定したエピソーム形態でのin vivo の細胞の核内の転写カセットの存続によって、in vivo での長期継続効果をもたらすコンストラクトを用いることが所望され得る。in vivo における宿主細胞のゲノムDNAへの転写カセットの組み込みは、直線化形態の注入遺伝子(コーディング領域のみ又は5'及び3'調節配列を共に有するコーディング領域であるが、如何なるプラスミド配列の存在もない)の投与によって促進され得る。更に、ある場合には、変異C F T R遺伝子の欠損若しくは不活化並びに、生物学的に機能的なC F T R分子のコーディング配列との置換が所望され得る。

本発明で使用するコンストラクトには、当該コンストラクトの用途に応じていくつかの形がある。従って、コンストラクトにはベクター、転写カセット、発現カセット及びプラスミドが含まれる。好ましくは、転写及び翻訳開始領域(時として“プロモーター”とも呼ばれる)は、転写開始調節領域と翻訳されない5'側配列の翻訳開始調節領域即ちリボソームへのmRNAの結合及び翻訳開始に寄与する“リボソーム結合部位”が入っていることが望ましい。開始調節領域の転写及び翻訳機能要素は、同一の遺伝子から由来又はこれから入手可能であることが望ましい。ある具体例では、プロモーターはエンハンサーなどの配列の追加、又は必須でない及び／又は望ましくない配列の削除によって改変される。“入手可能”とは、対象DNAの転写の所望な特異性を提供するために、本来のプロモーターと類似しているDNA配列を有するプロモーターを意図している。これには、天然配列と合成配列、更には合成配列と天然配列の組合せによる配列が含まれる。

転写開始領域、即ちプロモーター要素については、対象DNA配列の所望のレベルの転写を与えることを条件に、どの領域が使われ得る。転写開始領域は、宿主細胞及び／又は転写されるべきDNA配列本来のもの若しくは同種のもの、又は宿主細胞及び／又は転写されるべきDNA配列によって異物若しくは異種のもの

のとし得る。宿主細胞にとって異物とは、転写開始領域を含むコンストラクトを挿入される宿主に転写開始領域がみつからないということを意味する。DNA配列にとって異物とは、対象DNA配列に通常は伴わない転写開始領域のことを意味する。転写開始のための効率のよいプロモーター要素には、SV40 (シミアンウィルス40) 初期プロモーター、RSV (ラウス肉腫ウィルス) プロモーター、アデノウィルスメジャー後期プロモーター、及びヒトCMV (サイトメガロウィルス) 前初期1プロモーターが含まれる。

誘導プロモーターも、転写のタイミングを制御するのが望ましい本発明で有用である。このプロモーターの例には、 β -インターフェロン遺伝子、熱ショック遺伝子、メタロチオニン遺伝子由来の又はエクソソリンセプターをコードするものなど昆虫の遺伝子を含むステロイドホルモン反応性遺伝子由来のもの等が含まれる。このような誘導プロモーターは、インターフェロン又はグルココルチコイドなど外部刺激を利用した注入遺伝子の転写を調節するために用いることができる。真核プロモーター要素の構成はかなり柔軟性があるので、構成的要素と誘導要素との組合せを使用することもできる。2つ以上の誘導プロモーター要素の縦列配置では、単一の誘導要素で達成できるベースライン上の誘導レベルと比べた場合に、達せられる転写ベースライン上の誘導レベルを上げ得る。

一般に、調節配列は遺伝子の転写開始の5'側に約1.5 kbまでのDNAを含むが、これよりさらに小さくすることもできる。この調節配列は、部位特異的突然変異誘発により (クンケル(Kunkel) T.A., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 82, 488-492)、又は適当な制限部位がN末端コドン近くで見つければ、連結反応 (ライゲーション) によって都合のよいリンカーオリゴヌクレオチドを導入することにより、希望するタンパク質の最初のコドンに対応する位置で修飾され得る。理想的な具体例では、互換性のある制限部位を持つコーディング配列が、遺伝子のコドン#1に対応する位置で連結され得る。この置換物は、元のコーディング配列に完全に置き換えるようにして挿入され得、従って置換された配列は、その3'末端で遺伝子ターミネーター及びポリアダニル化シグナルと隣接する。

転写エンハンサー要素は、任意的には発現カセットに含まれ得る。転写エンハンサー要素とは、転写活性の基本的な調節因子であり、プロモーター要素による

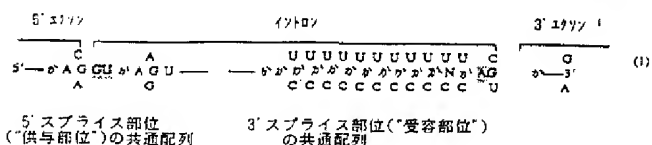
転写を増大させるように作用でき、しかも一般に転写活性を増強するためにプロモーターに対して5'方向にしくなくてもよいDNA配列を意図している。特定の発現カセットで使用されるプロモーター及びエンハンサー要素の組合せは、特定作用を最大限発揮させる技術に精通している者によって選択することができる。様々なエンハンサー要素を、多様な組織や細胞型における所望レベルの注入遺伝子発現を実現するために用いることができる。例えば、ヒトCMV前初期プロモーターエンハンサー要素を、*in vivo*で様々な組織において高レベルの注入遺伝子発現をもたらすために用いることができる。

多くの種からの多様な細胞型中で、連結された遺伝子に高レベルの転写をもたらす他のエンハンサー要素の例には、SV40及びRSV-LTRからのエンハンサーを含む。SV40及びRSV-LTRは、必須な構成成分である。これらは特異的作用を有する他のエンハンサーと組み合わせることもでき、特異的エンハンサーを単独で使用することもできる。従って、転写の特異的制御が所望されるときは、組織、発生段階又は細胞特異性様式でのみ活性な有効エンハンサー要素、例えば免疫グロブリン、インターロイキン-2 (IL-2) 及び β -グロビンエンハンサーが含まれる。組織、発生段階又は細胞に特異的なエンハンサーを使って、例えばBリンパ球やTリンパ球などの特定の細胞型、或いはミエロイド、赤血球前駆細胞中に注入遺伝子発現をもたらすことができる。或いは、高レベルの転写と組織特異性注入遺伝子転写とを得るために、ヒト癌胚性繊維症膜貫通型コンダクタンズ調節物質 (CFTR) 遺伝子由来のものなど組織特異性プロモーターを、きわめて活性が高く異種のエンハンサー要素、例えばSV40エンハンサーに融合することができる。更に、LCKのような組織特異性プロモーターの利用は、注入遺伝子転写をTリンパ球に付けることを可能にする。注入遺伝子の組織特異性転写は、標的組織以外の組織で注入遺伝子の転写が生じると有害な場合に、特に重要である。

2つ以上のエンハンサー要素又はエンハンサー要素の組合せの縦列 (タンデム) 反復は、単一のコピーのエンハンサー要素の使用と比べて注入遺伝子発現を有意に増大し得る; 従って、エンハンサー要素は発現カセットにおいて有用である。単一プロモーターに隣接する若しくはその内部にある、同一又は異なる供給源か

らの2種類のエンハンサー要素の使用は、ある場合では、個々のエンハンサーが単独で効果を有する個々の組織の中に注入遺伝子発現をもたらすことができ、それによって転写が達成される組織の数が増加する。他の場合では、2つの異なるエンハンサー要素の存在が、エンハンサー効果の沈黙化 (サイレンシング) を起こす。特別に希望する発現の効果又は組織について、エンハンサー要素の特定の組合せ方を評価することは、当該技術分野のレベル内である。一般には発現カセットにイントロンを含める必要はないが、静脈内又は腹腔内投与された注入遺伝子の高レベルで且つ広範囲な*in vivo*発現を得るために十分な介入配列によって離間された5'スプライス部位 (供与接合部) 及び3'スプライス部位 (受容接合部) を含むイントロンを、任意的に含めることもできる。概して、約100 bpの介入配列は、希望する発現パターン及び/又はレベルをもたらすが、希望する結果を得るために、必要に応じて配列の大きさを変えることができる。任意的なイントロンをコーディング配列の5'側に置くと、静脈又は腹腔内投与された注入遺伝子の高レベルで且つ広範囲な*in vivo*発現がもたらされるが、発現を得るためには一般に必要な。最適なのは、mRNA配列が嵌ってスプライスされる結果をもたらす潜在スプライス部位を5'イントロンが特異的に欠損していることである。これが用いられた場合、それぞれ5'から3'に編成されたイントロン・スプライス供与部位とスプライス受容部位が、下図の(1)に示すように転写開始部位と翻訳開始コドンの間に配置される。

RNAスプライシングで使用される5'及び3'スプライス部位に関する共通配列



ここに示した配列はRNA類についてのもの。イントロンの両端のほとんど非変異のジヌクレオチドGU及びAGはあみかけしてある。

或いは、介入配列は翻訳終結コドン及び転写ターミネーターの3'側又はコーディング領域の内に配置し得る。イントロンは、介入配列との流成イントロン又はゲノムコーディング配列から取ったイントロンとすることができる。コーディング領域の3'側のイントロン、100 bp未満の5'イントロン、あるいは潜在スプライス部位を含むイントロンは、一定の条件下で*in vivo*でもたらされる注入遺伝子発現のレベルを実質的に低下し得る。しかし、イントロンを欠くベクターを用いると、予期せずして、注入遺伝子の高レベルの*in vivo*発現を達成することができる。従って、*in vivo*トランスフェクションでは、このようなベクターは特に関心がもたれる。

転写開始調節領域の下流で且つその制御下には、1以上の宿主遺伝子型の変更及び宿主表現型の改変をもたらす対象核酸配列の挿入のための多重クローニング部位がある。都合のよいことには、多重クローニング部位は効率のよい方法で多彩な核酸配列に採用され得る。クローニング部位に挿入される核酸配列は、対象ポリペプチド例えば酵素をコードする全てのオープンリーディングフレームを持ち得る。ただし、そのコーディング配列が対象ポリペプチドをコードする場合に、適切なmRNA分子の生成を遮断する及び/又は嵌ってスプライスされた若しくは異常なmRNA分子の生成を起こし得る潜在スプライス部位を欠くべきである。当該核酸配列はDNAとし得る; また、ゲノム配列に相補的な配列とし得、この場合、ゲノム配列は1以上のオープンリーディングフレーム、イントロン、非コード化リーダ配列、又は、相補的配列が転写、メッセンジャーRNAプロセスング例えばスプライシング若しくは翻訳を阻害するような他の配列とし得る。

ゲノムDNAへの転写カセットの組み込みの発生率は、複製レトロウィルス酵素例えばHIV-1インテグラーゼ酵素を脂質キャリアーDNA複合体へ組み込むことによって増加し得る。適当なフランキンク配列は、該核酸の5'及び3'末端に配置される。これらのフランキンク配列が、HIV-1インテグラーゼの存在下において、宿主細胞ゲノムDNAへHIV-1 DNAの組み込みを仲介することは証明されている。或いは、ウィルス例えばエプスタイン-バーウイルスの非トランスフォーミング配列並びに、哺乳動物細胞において異種DNAをエ

ビゾームとして複製させるために十分と思われる ϕ r I P 及び E B N A-1 のような配列を含むコンストラクトを使用することで、in vivo における外来核酸の発現の持続期間を、延長することができる (ブハンス(Buhans)ら、Cell (1986) 52:955)。

基本的に、採用される終結領域は、比較的交換可能のようなので都合のよいところとなる。終結領域は、対象となる目的核酸配列に固有のもの又は、別の供給源に由来するものと得る。都合のよい終結領域が利用でき、遺伝子ターミネーターの3'末端及び、5'調節領域が得られる同一遺伝子からのポリアデニル化シグナルを含む。mRNAを安定化させるために、好ましくは必要に応じて3'から200まで又はそれ以上のアデニル化残基が含まれ得る。或いは、異なる単数又は複数の遺伝子からのターミネーター及びポリアデニル化シグナルを利用しても同じ様な結果が得られ得る。転写後のmRNAの安定性を調節する特定配列は任意的に含まれ得る。例えば、特定のポリA配列(ヴォロック(Volloch)ら、Cell (1981) 23:509) 及び β グロビンmRNA要素はmRNA中の安定性を高めることができ、またmRNAに特定のAU富含配列は、mRNAの安定性を下げることができる(シュー(Shyu)ら、Genes and Devel. (1989) 3:60)。更に、対象の遺伝子によって短い半減期のmRNAが所望される場合には、3'非コード化領域中のAU領域は、mRNAの安定化のために用いられ得る。

遺伝子の転写及びベクターのコンストラクション

本発明で使用される核酸配列は、既知の供給源、例えば希望する遺伝子を含む細胞からの核酸の単離により、標準的な技法を用いて得ることができる。同様に、遺伝子配列は、この分野で十分知られている標準的な方式のポリヌクレオチド合成を使って合成されることができる。例えばM. D. エッジ(Edge)、Nature (1981) 292:756; ナンバール(Nambair)ら、Science (1984) 223:1299; ジェイ(Jay)、アーネスト(Earnest)、J Biol Chem (1984) 259:6311を参照。一般に、合成オリゴヌクレオチドは、エッジら(Nature, 前記)及びダックワース(Duckworth)ら、Nucleic Acids Res (1981) 9:1691に記述されたホスホトリエステル法、又はS. L. ボカージュ(Beaucage)とM. H. カルサー(Caruthers)、

体的なやり方は、市販の制限酵素の製造業者から指定がある。ニューイングランド・バイオラボ(New England Biolabs)の製品カタログを参照。希望があれば、切断フラグメントのサイズ分離を、標準的な技法を用いてポリアクリルアミドゲル又はアガロースゲル電気泳動によって実施し得る。サイズ分離に関する一般的な説明については、Methods in Enzymology (1950) 65:499-560を参照。

制限切断フラグメントは、標準的な技法を用いて、4つのデオキシヌクレオチドトリホスフェート(dNTP)存在下で、E. coli DNAポリメラーゼ(クレノウ)の太フラグメントで処理して平滑末端化され得る。クレノウフラグメントは、5'側1本鎖オーバーハングを埋めるが、4つのdNTPが存在する場合でも、はみ出た3'側1本鎖を破壊する。希望とあれば、オーバーハングの性質による限界内において、1種又は選択したdNTPを与えて、選択的修復を実施することができる。クレノウで処理した後に、混合物を、例えばフェノール/クロロホルムで抽出し、エタノール沈殿することができる。適当な条件下でS1ヌクレアーゼ又はBAL-31を使って処理すると、どの1本鎖部分も加水分解される。

希望するタンパク質についてのコーディング配列が調整若しくは単離されたならば、それを適当なベクター又はレプリコンにクローン化することができる。当業者は、多数のクローニングベクターを知っている; 適当なクローニングベクターの選択は、当業者がよく知っており、適当なクローニングベクターとして何をとりかは各自で選択できる。他の配列への連結反応(ライゲーション)は、その分野でよく知られている標準的な手順によって行われる。例えば、2.0 mM トリス-HCl pH 7.5、1.0 mM MgCl₂、1.0 mM DTT、3.3 μ g/ml BSA、1.0 mM ~ 5.0 mM NaCl、並びに、4.0 μ M ATP、0.01 ~ 0.02 (Weiss)単位T4 DNAリガーゼを0°Cで(“付着末端”連結用)、又は1 mM ATP、0.3 ~ 0.6 (Weiss)単位T4 DNAリガーゼを14°Cで(“平滑末端”連結用)で連結反応を実施することができる。分子間の“付着末端”連結反応は、通常、3.0 ~ 1.00 μ g/mlの総DNA濃度(総末端濃度5 ~ 1.00 nM)で行われる。

核酸配列は、プロモーター、リボソーム結合部位、及び任意的なオペレーター

Tet. Letts. (1981) 22:1859 及びM. D. マッテウッチ(Matteucci)とM. H. カルサー、J. Am. Chem. Soc. (1981) 103:3185 に記述されているホスホルアミダイト法で調製され、また市販の自動オリゴヌクレオチドシンセサイザーを使って調製されることもできる。遺伝子配列を、特定のアミノ酸配列のための適当なコドンを使って設計することができる。一般に、目的とする宿主における発現のための好ましいコドンが選択される。標準的な方法で調製された重複するオリゴヌクレオチドから完全な配列が組み立てられ、完全なコーディング配列に組み立てられる。エッジ、Nature (1981) 292:756; ナンバールら、Science (1984) 223:1299; ジェイら、J. Biol. Chem. (1984) 259:6311などを参照。部分的CFTR cDNAクローンT11、T18-1、T18-4.5及びC1-1/5(リオルダン(Riordan)ら、Science (1989) 245:1066-1073)は、アメリカン・タイブ・カルチャー・コレクション(メリーランド州、ロックランド)から入手される。CFTRタンパク質及びその種々の変異体をコードする完全単離DNAは欧州特許出願第91301819.8号に開示されている。また、グッドフェロー(Goodfellow)、P. Nature (1989) 341:102-103; ロメンズ(Rommens)ら、Science (1989) 245:1059-1054; ベアスレイ(Beardsley)ら、Sci. Am. (1989) 261:28-30も参照のこと。対象となるタンパク質の変異体又はアナログ(類似物)を作製することが望ましいとされ得る。変異体又はアナログは、該タンパク質をコードする配列の一部を欠損することによって、配列を挿入することによって及び/又は該配列内で1以上のヌクレオチドを置換することによって製造し得る。変異は、正常産生タンパク質の全身性副作用を排除又は減少するように、該タンパク質の産生に作用するものとして行うことができる。ヌクレオチド配列の改変技術例えば部位特異的突然変異誘発は、当業者にはよく知られている。例えば、サムブロックら、後出; DNA Cloning, I 及びII巻、前出; Nucleic Acid Hybridization, 後出を参照のこと。

脂質キャリアー核酸の調製に使用される核酸を得るのに特に便利な方法は、組換え法を用いることである。即ち、標準的な制限酵素と手順を用いて、CFTR遺伝子を選ぶプラスミドから該希望する遺伝子を切除することができる。部位特異的DNA切断(開裂)が、この分野で一般に理解されている条件下において適切な単数又は複数の制限酵素を使って処理することにより、実施される。その具

(ここではこれらをまとめて“制御”要素という)の制御下に置いて、コーディング配列が脂質キャリアー核酸によりトランスフォームされた宿主組織中でRNAに転写されるようにする。コーディング配列には、シグナルペプチド又はリーダー配列が入っていても、入ってなくてもどちらでもよい。“プロモーター配列”は、細胞中でRNAポリメラーゼを結合することができ、また下流(3'方向)のコーディング配列の転写を開始できるDNA調節領域である。本発明物の説明にあたっては、プロモーター配列はコーディング配列の転写開始コドン(ATG)を3'末端に結合し、上流(5'方向)に広がってバックグラウンドよりも高く検出可能なレベルで転写を開始するのに必要な最小限の塩基又は要素を含むものとする。プロモーター配列内には、転写開始部位(ヌクレアーゼS1によるマッピングでうまく定義される)、並びにRNAポリメラーゼの結合を担当するタンパク質結合領域(共有配列)がある。核酸“制御配列”又は“調節領域”とは、プロモーター配列、リボソーム結合部位、ポリアデニル化シグナル、転写終結配列、上流調節領域、エンハンサー等をまとめて呼んだもので、これらは、まとめて宿主細胞におけるコーディング配列の転写及び翻訳をもたらす。

調節要素の選択は、トランスフォームされるべき宿主細胞及び用られた核酸調製物のタイプに依存する。従って、宿主細胞の内在性転写及び翻訳機構を使って、CFTR分子を発現する場合、発現をもたらす個々の宿主中で機能する制御要素が用いられる。哺乳動物細胞中で使用される幾つかのプロモーターは、この分野では知られており、例えばSV40(シミアンウィルス40)初期プロモーター、RSV(ラウス肉腫ウィルス)プロモーター、アデノウィルスメジャール後期プロモーター、及びヒトCMV(サイトメガロウィルス)前初期1プロモーターがあるが、これらには限定されない。使用され得る他のプロモーターとしては、マウス乳癌ウィルス(MMTV、T7、T3等)由来のものが含まれる。本発明で特に有用なのは、RSVプロモーター及びCMVプロモーター、とりわけCMVのAD168株から得られる前初期プロモーターである。上記の配列に加えて、CFTR分子の発現を調節できる調節配列を、核酸コンストラクトに追加することが望ましいとされ得る。調節配列は当業者によく知られているもので、例えば、調節成分の存在など、化学的又は物理的刺激に反応して遺伝子の発現をオン又は

オフさせるものが含まれる。このようなプロモーターを使い、例えばインターフェロン又はグルココルチコイドなどの外部刺激を利用することで、注入遺伝子の発現を調節することができる。

プラスミドには、その他のタイプの調節要素も存在し得る。例えば、エンハンサー配列である。この種の調節要素としては、 β -インターフェロン、熱ショック、メタロチオネイン又はステロイドホルモン反応性遺伝子から得られるものがあり、これにはエクジソンリセプター遺伝子など昆虫遺伝子が含まれる。真核プロモーター要素の編成はきわめて柔軟性があるので、構成的要素と誘導要素とを組み合わせて使用することもできる。2つ以上の誘導プロモーター要素の縦列配置は、単一の誘導要素で得られることができる転写ペースラインより上に誘導レベルを高くし得る。転写エンハンサー要素とは、プロモーター要素からの転写を増大させることができる転写活性の主な調節因子であり、一般に転写活性を増強するためにプロモーターに対して5'の方向になくてもよいDNA配列のことである。

特定の核酸コンストラクトで使用されるプロモーター要素とエンハンサー要素との組合せは、特定の効果を最大にするための技術に熟練した者によって選択できる；異なるエンハンサー要素を使って、希望するレベルの注入遺伝子発現をもたらすことができる。例えば、高レベルの発現と、主として肺における該核酸の発現とを共に得るために、ヒト囊胞性繊維症肺臓通型コンダクタンズ調節物質(CFTR)遺伝子に由来するものなど組織特異的なプロモーターを、きわめて活性の高い異なるエンハンサー要素、例えばSV40エンハンサーに隣接して用いることができる。2つ以上の誘導プロモーター要素の縦列配置、又はエンハンサー要素の組合せは、単一コピーの誘導要素の使用に比べて、転写を有意に増加する。単一プロモーターに隣接又はその内部にある同一又は異なる供給源からの異なる2種類のエンハンサー要素が使用され得る。特定の希望する効果又は発現レベルのためのエンハンサー要素の特定の組み合わせの評価は、当業者の知るところである。少なくとも一部はCMV Townes及び/又はAD169株に由来するプロモーター-エンハンサー要素は、高レベルの注入遺伝子発現をもたらすものとして特に関心的である。

コーディング配列を直接クローン化することもできる。

脂質キャリアの構築

本発明で使用する脂質キャリアは、陽イオン性(正荷電)、陰イオン性(負荷電)及び中性の調製物を含む。しかし、陽イオン性脂質キャリアが、陽イオン性脂質キャリアとポリアニオンの核酸との間で密な電荷複合体(light charge complex)を作ることができるため特に好ましい。例えば、これは、噴霧力と肺気道環境の両方に耐えられ、しかもエアロゾル化したDNA:脂質キャリア複合体が肺に沈着した後で肺細胞のトランスフェクションを行うことのできる脂質キャリア-核酸複合体をもたらす。陽イオン性脂質キャリアは、機能形態のプラスミドDNA(フェルグナー(Felgner)ら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA (1987) 84:7413-7415)、mRNA(マロン(Malone)ら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA. (1989) 86:6077-6081)、及び複製転写因子(デブスら、J. Biol. Chem. (1990) 265:10189-10192)の細胞内送達を仲介することがわかっている。

部位特異的分子を用いて、脂質キャリアが特定タイプの細胞に向かうように修正することによって、肺内及び肺外器官の特定細胞を標的とすることができる。そこで、特定の表面抗原と会合する細胞を標的とするために、特定リセプターに対する抗体又はリガンドを採用し得る。特定のリガンド又は抗体を、慣用の方法に従って脂質キャリアと結合させ得る。その方法は、部位特異的分子を脂質に結合させて脂質二重膜に組み込むか、あるいは二重膜に存在する脂質に連結基を提供して部位特異的成分の機能部位に連結するかのいずれかをとる。このような技術は当業者にはよく知られている。正確な肺内でのターゲティングは、a) エアロゾルが肺胞に若しくは気道の近位から遠位に優先的に向かうようにエアロゾル粒子の大きさを変えること、又は、b) 脂質キャリア表面にモノクローナル抗体を共有結合で結びつけ、それによって対応する細胞表面抗原を発現する肺細胞に指向させること、若しくは、特定の肺細胞のタイプに対して特定の親和性を有する特異的陽イオン性脂質を用いることによって達成されることがある。

リポソームを脂質キャリアとする様々な脂質キャリア-核酸複合体が、既知の方法で作製される。例えばストロービング(Straubinger)らのMethods of Imm

基本的には、終結領域は相対的に交換可能のようなので、採用される終結領域は都合のよいところとする。終結領域は、CFTR遺伝子に固有のもので、別の供給源に由来するものでもよい。都合のよい終結領域が利用でき、遺伝子ターミネーターの3'末端及び、5'側の調節領域を得た同一遺伝子からのポリアデニル化シグナルを含む。mRNAを安定化させるために、アデニル化残基を、できれば必要に応じて3 kb以上及び200 kbまで又はこれ以上で含む得る。或いは、CFTR遺伝子以外の単数又は複数の遺伝子からのターミネーター及びポリアデニル化シグナルを利用して同じ様な結果が得られ得る。転写後mRNAの安定性を調節する特定配列を任意的に含む得る。例えば、特定のポリA配列(ヴォロックら、Cell (1981) 23:509)及び β グロビンmRNA要素はmRNAの安定性を高めることができ、一方、mRNAに特定のAU富集配列は、mRNAの安定性を低下させることができる(シュール、Genes and Development (1989) 3:80)。更に、mRNAの半減期が短いほうが好ましい場合には、3'非コード化領域のAU領域を使ってmRNAを不安定にしてもよい。

核酸コンストラクトには、選別のための配列としてネオマイシン耐性遺伝子、ジヒドロ葉酸レタクターゼ遺伝子及び/又は、異なる細胞成分を標的とするため、特に該核酸発現産物の分泌をもたらすために、組換えタンパク質を生成するためのシグナル配列を含む得る。様々なシグナル配列は全て用いられ得、これらは当業者によく知られ、例えば、該タンパク質の核局在化(?)をもたらすアミノ酸のベーシックな配列をコードし得る。

転写ベクターは、特定のコーディング配列が適切な調節配列とともにベクター内に位置するように構築され、制御配列に対するコーディング配列の位置及び方向は、コーディング配列が制御配列の"制御"下で転写されるようなものになる。この目的を達成するには、対象の特定タンパク質をコード化する配列を修飾することが望ましい。例えば、場合によっては、適当な方向で制御配列に接続し得るように配列を変更したり；あるいはリーディングフレームを維持する必要がある。制御配列及び他の調節配列は、ベクターに挿入する前にコーディング配列に連結され得る。或いは、既に制御配列及び制御配列の調節制御を有し、その制御下にあるリーディングフレーム内の適当な制限部位を含有する発現ベクターに、

unology (1989), Vol. 101, pp.512-527を参照。"脂質キャリア-核酸複合体"とは、一般に、後述するように脂質キャリア調製物の表面に結合された前述の核酸配列を意味する。脂質キャリア調製物には、組込み、転写及び翻訳に必要な酵素、補因子などの物質を含むことができる。更に、脂質キャリア-核酸複合体には、複合体を特定の細胞又は組織タイプに送達するためのターゲティング物質を含むこともできる。核酸を捕獲することを所望する場合には、ガラスチューブの壁上にリン脂質の薄膜を沈着し、次いで捕捉されるべき物質の溶液で水和してボルテックス処理することによって、核酸を含有するMLVを調製することができる。

核酸物質は、脂質キャリアを調整してボルテックス処理したばかりのMLV又はSLVの懸濁液に添加される。陽イオン性脂質を含有する脂質キャリアを用いるときには、乾燥脂質フィルムを適当な混合溶液、例えば滅菌水又は等張緩衝液例えば10 mMトリス/NaCl、又は5%デキストロース水溶液に再懸濁し、音波処理してから、できあがった脂質キャリアをDNAと直接混合する。脂質キャリア及びDNAは、負に荷電したDNAが陽イオン性脂質キャリアに結合するので、きわめて安定した複合体を形成する。SUVは、DNAの大きな領域(≥250 kb)だけでなく、小型の核酸フラグメントと共に用いられる。

脂質キャリア-核酸複合体の調製にあたっては、脂質キャリア-核酸複合体の凝集形成を促し得る化合物を混合溶液からいっさい排除するよう注意しなければならない。エアロゾル投与においては、大型粒子は一般に噴霧器(ネブライザー)ではエアロゾル化されず、またたとえエアロゾル化されたとしても、気道の大きな部分よりも奥まで浸透するには大き過ぎる。脂質キャリア-核酸複合体の凝集は、脂質キャリアに対するDNAの比を調整し、溶液中のDNA:脂質キャリア複合体の全体的濃度を最低に抑え(通常は5 mg DNA/8 ml未満)、またEDTAのようなキレート剤や有意量の塩など凝集体形成を促進する傾向のあるものを避けることによって妨害される。好適な賦形剤は、水、デキストロース/水、又はイオン強度が小さい又はない溶液である。更に、宿主哺乳動物の肺における沈着を最低限にするよう容量を調節しなければならないが、同時に溶液が濃縮されすぎて凝集体が生じないようにも注意しなければならない。

従って、脂質キャリア及び脂質キャリア-核酸複合体の濃度の選択は、2段階

で行われる。第1段階では、構成要素を結合するとき又は噴霧化段階で行われる混合物の大きな濃度中に凝集を生じないような、脂質キャリア及び脂質キャリア-核酸複合体の濃度を同定することである。第2段階では、第1段階で候補となったもの(すなわち凝集を起こさないもの)の中から、肺の標的細胞において対象遺伝子の転写及び発現を高レベルでもたらすような複合体を同定することである。発現のレベル及び組織発現遺伝子の発現が起こる細胞のタイプは、mRNAレベル及び/又はポリペプチドもしくはタンパク質のレベルで決定され得る。遺伝子産物は、組織におけるその生物活性を測定することによって定量され得る。例えば、酵素活性はバイオアッセイによって、あるいは免疫染色法例えば発現カセットに存在する遺伝子産物又はレポート遺伝子産物を特異的に認識する抗体を用いたプロービングにより、トランスフェクトされた細胞における遺伝子産物を同定することによって測定されることが出来る。

1例として、リポーター遺伝子CAT(クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼをコードする)を発現カセットに挿入し、対象脂質キャリア組成それぞれを評価するのに用いることができる。DNA:脂質キャリア複合体は、滅菌水など、それ自体がDNA:脂質キャリア複合体の凝集を招くことのない溶液中で混合しなければならない。発現カセット(DNA)を、脂質キャリアと一緒に混ぜて、例えば4:1から1:10(DNAマイクログラム対陽イオン性脂質ナノモル)の範囲の複数の異なる比について試験する。その結果から、どのような比であるとDNA:脂質キャリア複合体の凝集が生じるか、従ってin vivoに利用できないか、またエアロゾル化するのに適した形のまま残っているのはどの複合体かといった情報が得られる。凝集を生じない比について、動物モデルで試験して、どのDNA:脂質キャリア比がin vivoでの注入遺伝子発現の最も高いレベルになるかを確かめる。例えば、DOTMA/DOPE、DDAB:コレステロールについてのSUVに関する最適DNA:脂質キャリア比は1:1又は1:2であり、エチルホスファチジルコリン(E-PC及びエチルジミリスチルホスファチジルコリン(E-DMPC)である。

エアロゾル化投与

与することができる。このような方法をとる場合の条件は、必要な用量を投与しても刺激がありすぎず、また、肺胞への沈着を可能にするように、直径が0.5 μm から約5 μm の範囲の粒子が粒子全体の中かなりの数を占めるような脂質キャリア-核酸複合体を選ぶことである。近位気道への送達には、平均粒子サイズは、これより大きくなる。例えば、これに適した粒子の平均直径は一般に約1.5 μm 未満、好ましくは約4 μm 以上であり、最も好ましいのは約5〜約10 μm の範囲である。

肺胞送達に有用な噴霧器の例としては、Acorn I噴霧器、及びRespirgard II(商標名)噴霧器システムが挙げられる。いずれもマルケスト・メディカル・プロダクツ(Marquest Medical Products, Inc)社(イングルウッド、コロラド州)から入手できる。その他、本発明と共に使用できる市販の噴霧器としては、マリנקロッド(Mallinckrodt)社(メリーランドハイツ、ミズーリ州)のUltraVent(商標名)噴霧器、Wright(商標名)噴霧器(B. M. ライト、Lancet (1958) 3:24-25)、及びDeVilbiss噴霧器(マーサー(Mercer)ら: Am. Ind. Hyg. Assoc. J. (1968) 29:66-78、T. T. マーサー、Chest (1981) 80:8(Sup)813-817)が含まれる。喘息治療に普通に用いられている噴霧器も、気道送達に有用である。この種の噴霧器も市販されている。当業者は、噴霧器から生成された粒子の平均粒子サイズを測定することによって、特定の場合にどの噴霧器が有用かを決定することができる。それによって、例えば、7段階マーサー・カスケードインパクター(イントックス・プロダクツ(Intox Products)、アルバカーキ、ニューメキシコ州)を使う。脂質キャリア-核酸複合体を溶出し、適当な液長で最適密度を評価し、標準曲線と比較することによって、インパクタープレートから複合体の濃度を調べる事ができる。結果は普通、質量メジアン空気力学的径土幾何標準偏差で表す(ラーブ: J. Aerosol Sci. (1971) 2:289-303)。

使用する脂質キャリアの量は、DNA又は複合体が肺に入った後に細胞の十分なトランスフェクションをもたらす、トランスフェクションされた細胞中に治療効果レベルの転写及び/又は翻訳をもたらすのに十分な量とする。転写及び/又は翻訳の治療効果レベルとは、脂質キャリア-核酸複合体を宿主哺乳動物の肺、

哺乳動物宿主は、遺伝的疾患の症状を持つものであればどの哺乳動物でもよい。従って、適用対象は家畜、飼育動物例えばウシ、ヒツジ、ブタでも、霊長類とりわけヒトでも利用できる。本発明の方法では、非相込みの治療用プラスミドを、脂質キャリア特に陽イオン性脂質キャリア、より特別にはヒトに使用する場合、あるいは反復投与する場合には生分解性脂質キャリアに複合させて、哺乳動物宿主に導入してin vivoでのトランスフォーメーションがもたらされる。哺乳動物宿主の導入のために、全ての生理的許容媒体が、DNA又は脂質キャリアの投与に用いられ得、例えば脱イオン水、5%デキストロース水溶液などがある。配合においては、他の成分例えば安定剤、生物致死剤等が含まれ得、先に戦略を述べた基準、即ち複合体の凝集を生じないという基準を満たすことを条件とする。上に列挙した様々な成分は、文献に具体例がいろいろあるので、ここでは詳しく述べる必要はない。

ヒト又は他の霊長類におけるエアロゾル化送達において、マウスピース又はフェイスマスク等々を通してエアロゾルを送る医療用噴霧器システムでエアロゾルを発生させ、哺乳動物宿主はそこから肺にエアロゾルを吸い込むことができる。目下知られている噴霧器は様々あり、本発明の方法でも使用できる。例えば、ボイアスキ(Boiarski)ら、米国特許第4,268,460号; レンベック(Lehmbeck)ら、米国特許第4,253,488号、米国特許第4,046,146号; ハブスツッド(Havstad)ら、米国特許第3,826,255号; ナイト(Knight)ら、米国特許第4,649,911号; ボルドニ(Bordoni)ら、米国特許第4,510,829号を参照。どの噴霧器システムを選ぶかは、肺胞送達が望ましいか気道送達(すなわち気管、第1、第2又は第3気管支等)が望ましいかに依存している。

核酸の肺胞への効率的な送達を確保にするやり方は、十分に小さな粒子、例えば平均粒子直径が5.0 μm 未満の粒子を生み出す噴霧器を選ぶ。平均粒子直径が約0.2〜約4.0 μm の粒子がなお好ましく、更に最も好ましいのは、粒子の平均直径が約0.2〜約2 μm のものである。それというのも、大きい粒子($\geq 5 \mu\text{m}$)は一般に近位気道又は鼻咽頭に沈着するからである。かなり肺胞に沈着させるために粒子の平均直径を小さくするもう一つの方法として、平均直径がより大きい粒子を、脂質キャリア-核酸調製物をかなり高い用量で投

与に肺胞又は気道に投与した後に宿主哺乳動物の疾患を予防、治療又は軽減するに十分な量のことである。従って、エアロゾル化された脂質キャリア-核酸調製物の「有効量」とは、症状を緩和もしくは軽減する、症状の悪化を阻止する、症状の発現を予防するなど、治療を果すために十分な量のことである。有効量を含む本組成物の投与量は、本開示を参考に、適当な対照物を使ってルーチンの試験を行い、通常の方法で決定できる。適当な処理群を対照群と比較すれば、特定の投与量が特定の症状の予防又は軽減において有効か否かがわかるだろう。適切な用量については、以下で更に議論する。肺胞に送達された脂質キャリア-核酸複合体の実際の量を直接測定する方法はないが、気管支肺胞洗浄(BAL)を利用して大気道及び気管支に沈着したタンパク質のクリアランスを可能にするため、通常は吸入の18〜24時間後に、全ての発現した及び分泌されたタンパク質の肺胞濃度を間接的に測定することができる。

哺乳動物宿主に送達された核酸の総量は、多数の要因によって左右され、これには、エアロゾル化物の総量、噴霧器のタイプ、粒子の大きさ、哺乳動物宿主の呼吸パターン、肺疾患の重症度、エアロゾル化溶液中の脂質キャリア-核酸複合体の濃度と平均直径、並びに吸入治療実施期間が含まれる。従って、気道中の測定された発現タンパク質の量は、エアロゾル中に存在する核酸の量から発現すると予想されるものよりもかなり少なくなることがある。なぜならば、核酸複合体のかなりの部分が投与対象により呼吸されるか、噴霧装置の内部表面に捕捉されることがあるからである。例えば、噴霧器に入れた脂質キャリア-核酸の量のほぼ3分の1は、吸入が完了した後に噴霧器及び付随チューブ内に残っている。これは用量、吸入時間、使用する噴霧器のタイプに関係ない。更に、残留物を再懸濁して再度投与しても、投与対象に送達される用量は有意には増加せず、約3分の1は噴霧器中に残留する。更に、コード化されたタンパク質の発現効率、使用される発現系によって大きく異なる。

上述した交絡因子があるとはいうものの、当業者は、有効なプロトコルを、特にエアロゾルの粒子の大きさが最適である場合には、容易に作成することができる。特に、噴霧器の推定効率に基づいて判断すると、有効送達用量は通常、約1〜約500 mg/治療1回の範囲内になるが、投与対象や希望する結果によって

はこれより多くても少なくとも有効なことがある。一般に、重症例を治療するときにはより高い用量で投与するのが望ましい。一般に、核酸は宿主細胞ゲノムに組み込まれないので、必要とあれば、目指す結果に依存した目的に応じて治療を繰り返すことができる。治療を繰り返す場合には、哺乳動物宿主をモニターして、投与に対する副作用的な免疫応答が生じていないかを確認する。治療の頻度は、多くの要因例えば投与あたりの脂質キャリアー核酸複合体の量、更には投与対象の健康状態や既往歴によって決まる。ここで投与量に関連して「脂質キャリアー核酸エアロゾル」という場合には、噴霧器中に入れられてエアロゾル化される脂質キャリアー核酸複合体の量をいう。複合体の「噴霧された量」又は「エアロゾル化された量」とは、エアロゾルとして装置から実際に出された量のことであり、即ち、装置に入れられた量から、投与セッション終了時点でレーザーバー及び装置内側表面に残留している量を差し引いたものである。

気管支炎や肺炎など肺感染症を治療するために、連続して約4〜約21日あるいはそれ以上にわたって、毎日1回以上投与を行う必要があるのが普通である。治療は通常、感染が治癒するにつれて肺の新たな領域が核酸の浸透及び沈着を受けやすくなるので、毎日連続して行う。治療がうまくいっているかどうかをモニターし、従来からの臨床基準を評価して投与計画を変更することができる。例えば、X線写真における浸潤の消失、動脈血PO₂の改善(例えば>70mmHg)、呼吸困難の減少、呼吸数、熱などの基準である。囊胞性線維症など遺伝疾患の治療のためには、脂質キャリアー核酸複合体を週に1回から1〜数カ月毎の定期的な間隔で、危険な状態にある宿主の気道細胞中で正常CFT Rタンパク質と置換するために投与する。というのも、これらの細胞は代謝回転を行い続けるからである。CFT R遺伝子を適当な肺幹細胞に安定してトランスフェクトすることも可能であり得、その後、一生治療を続ける必要なしに正常な気道細胞源を提供し続けることができる。遺伝子産物の潜在的な治療効果は、注入遺伝子が発現している遺伝子導入の宿主哺乳動物の生存率における遺伝子発現の効果を明らかにすることによって測定されることができる。有意量の注入遺伝子産物の産生は、関連する宿主の生存率を大いに延長し、生活の質を改良するだろう。

ポリペプチド/タンパク質、あるいはmRNA自体の発現によって宿主におけ

キャリアと複合化され得る。脂質キャリアは種々の陽イオン性脂質から製造されることができ、DOTAP、DOTMA、DDAB、L-PE等が含まれる。陽イオン性脂質例えば、「リポフェクチン」として知られる{N(1-(2,3-ジオレイロキシ)プロピル)-N,N,N-トリエチルアンモニウム}クロライド(DOTMA)、ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロマイド(DDAB)、1,2-ジオレイロキシ-3-(トリメチルアンモニオ)プロパン(DOTAP)又はリシニルホスファチジルエタノールアミン(L-PE)と、第2脂質例えばジステアロイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)又はコレステロール(Chol)とを含有する脂質キャリアは、特に対象となる。DOTMA合成はフェルナー(Felgner)ら、Proc.Natl.Acad.Sci.,USA.,(1987) 84:7413-7417に記載されている。DOTAP合成はスタマタス(Stamatatos)ら、Biochemistry (1988)27:3917に記載されている。DOTMA:DOPE脂質キャリアは例えばBRL社から購入できる。DOTAP:DOPE脂質キャリアはベリンガー・マンハイム社から購入できる。コレステロール及びDDABはシグマ社から市販されている。DOPEはアバンチ・ポーラー・リピド(Avanti Polar Lipids)社から市販されている。DDAB:DOPEはプロメガ社から購入できる。生分解性陽イオン性両親媒物はまた、ポリアニオン性DNAと安定した複合体を形成することか証明されている。

陽イオン性リポソームが、核酸を広い範囲の種々の培養細胞に送達することによって、注入遺伝子又はmRNAの高レベルの細胞性発現を仲介することができることが証明されている。特定陽イオン性脂質の使用は、in vivo 送達のための特殊な利点を確立できる。例えば、DOTAP含有リポソームの静脈注入は、肺に対する初期の注入遺伝子発現を爆発的とすることができる。その上、DOTAP、E-PC及びE-DPMCはL-PE及びCEBAと同様に、細胞によって十分に代謝され排出されるが、DOPMAは細胞によって十分に代謝されない。従って、DOTAP、E-PE、E-DPMAC及びL-PEは、哺乳宿主への反復注入に適しているが、DOTMAは、そうではない。更に、陽イオン性脂質と第2脂質とを複合化することは、まず、コレステロール又はDOPEがin vivo で注入遺伝子発現を最大にすることができる。例えば、DOPEの代わりにステロ

生化学的表現型に変化が生じる場合には、新たな表現型の存在又は古い表現型の不在が評価され得る；例えば、宿主細胞のトランスフォーメーションの結果として、不十分な量で以前に産生されていた既存の所望の産物の産生が増強され得、又はアンチセンス、リボザイム又は同時抑制技術を用いて、望ましくない遺伝子産物の減少若しくは抑制さえも起こり得る。減少又は抑制の場合には、遺伝子産物の減少や消失が測定され得る。

治療の潜在的な毒性については、目に見える行動によって、また適宜、生検標本の分析によって評価し得る。従って、活動レベルの変化、飲食パターンの変化などのジストレスを示す行動を、また生検標本では壊死、水腫又は炎症をモニターすることができる。

本発明の組成物は、1ないし複数の手順で使うことができる。キットには、裸のDNA及び脂質キャリアに複合させたDNAのいずれかとしてDNAを通常含む。更に、提供されたDNAと複合させるための脂質キャリアが、別の容器で提供される。DNA又は脂質キャリア/DNA複合体は使用前に希釈される濃縮物として存在し得、又は使用濃度で提供され得ることもあり、この場合には1回ないし複数回の投与分のバイアルが含まれ得る。便宜のために、1回投与量を噴霧器で使用するのに適した減壓容器に入れて提供され得、こうすると、医師又は獣医はその容器を噴霧器に直接用い得る。この場合、容器には希望する量及び濃度の薬剤を入れておく。従ってキットには、適当な比率の量のDNA又はDNA/脂質キャリア複合体と、任意的に適当な希釈液や混合液が入る複数の容器を有し得る。直接使用のための配合物が容器に入っている場合には、この方法において他に使用すべき試薬はない。

全身性投与

5'末端でプロモーター及び調節配列に隣接し3'末端でターミネーター及び調節配列に隣接している組み換えコーディング配列は、宿主細胞への発現プラスミドのみの導入の後に、宿主細胞中の直接的DNA取込みにおける使用に好適なクローニングプラスミド(例えばpUC18、pSP72)へ導入され得る。核酸コンストラクトは、またキャリア例えば脂質キャリア、特に陽イオン性脂質キ

ャリ例えばコレステロールと、DOTAP、E-PC、E-DPMC、DOTMA若しくはDDABとの混合は、実質的にin vivo における注入遺伝子の発現を増加する。

投与の経路及び投与の部位に依存して、特定の細胞及び組織が標的にされ得る。例えば、血流の方向で注入部位に最も近い組織のトランスフェクションは、如何なる特殊な標的化もなくトランスフェクトされ得る。特定の陽イオン性脂質は、全身性注入の後、in vivo で特定の細胞型に陽イオン性脂質キャリアを送らせることができる。更に、所望するならば、脂質キャリアは部位指向性分子(site-directing molecules)を用いて特定の型の細胞へ脂質キャリアを指向するように改変され得る。従って、特定のリセプターに対する抗体又はリガンドが、特定の表面タンパク質と会合された標的細胞と共に用いられ得る。例えばAIDSウィルスを用いた場合、AIDSウィルスはCD4表面タンパク質を有する細胞にまず指向する。脂質キャリアの表面に結合された抗CD4抗体を担持することによって、該脂質キャリアはTヘルパー細胞にまず指向する。特定リガンド又は抗体は、脂質二重膜への取込みのために部位指向性分子を脂質に結合することによって、又は部位指向性成分の機能性部位(functionality)を連結するために致二重膜に存在する脂質上の連結基を提供することによって、慣用の方法により脂質キャリアに結合され得る。このような技術は当業者にはよく知られている。リガンド指向性DNA-ポリカチオン複合体が、静脈注入後に肝臓の肝細胞へトランスフェクトすることがわかっている；この手段によって他の細胞型又は組織型をトランスフェクトする能力は、証明されていない。非陽イオン性脂質キャリア、特にpH感受性リポソームは、in vivo 遺伝子治療のための他の魅力的な手段の可能性を提供する。しかし、陽イオン性リポソームに比べて、pH感受性リポソームは、DNAの被包化及び細胞内でのDNAの送達において効率が劣り、血清の存在下で不活化し得るので、静脈内における使用が制限される。

予期せぬことに、注入されたリポソーム脂質組成物又は脂質キャリアの平均直径(リポソームのような粒形状の場合)は、in vivo でもたらされた注入遺伝子のレベルに劇的に作用することができる。従って、リポソーム脂質組成物は一般に、非陽イオン性脂質に対する陽イオン性脂質のモル比が50%の組成物である

が、5〜100%の範囲を採り得る。脂質キャリアの直径は、概ね100nm〜100μmの範囲内とする。陽イオン性脂質キャリアーDNA複合体は脂質キャリアが100nmから数μmの範囲である場合には、哺乳動物宿主への全身性導入後に、有意なレベルの注入遺伝子発現をもたらすことができる。

500nmを超える脂質キャリアの使用(言い換えれば多重ラメラ小胞(MLV)又は大単ラメラ小胞(LUV))は、小単ラメラ小胞(SUV)と比較した場合、ある場合には、哺乳動物において達成される注入遺伝子の発現のレベルを有意に増加することができる。MLV及びLUVは乾燥脂質フィルムに水性物質を添加した後に、音波粉碎よりもむしろボルトックス処理によって製造される。所望するならば、得られた脂質キャリアを、決まったサイズのポリカーボネート膜を通して高圧下で押し出して、より均一なサイズ分布に達することができる。

また予期せぬことに、特定の脂質キャリア対核酸比の使用が必須であり、用いられる比が注入遺伝子がin vivo で発現するか否か及びそのレベルを規定し、最適化するために必要であり、これは種々のコンストラクトの性質、脂質キャリアのサイズ及び脂質組成物並びに、MLVかSUVか、投与の経路及び宿主哺乳動物を含む種々の因子に依存する。例えば、リポーター遺伝子であるCAT(クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ)を用いれば、約1:1(0.5:1から2:1の範囲)のDNA対脂質キャリア比(μg DNA対nmolの陽イオン性脂質)は、腹腔投与後の全ての器官におけるマウスで最も高い遺伝子発現をもたらす。約1:4比(2:1から1:7の範囲)は、静脈投与後の全ての器官における最も高いレベルの遺伝子発現をもたらす。最適条件を用いて広範な組織での高いレベルの注入遺伝子発現の達成に加えて、肺、脾臓、リンパ節及び骨髄に存在する全ての細胞の大部分は、心臓に存在する全ての内皮細胞の大部分と同様に、in vivo でトランスフェクトされる。

DNA:脂質キャリア比は、注入遺伝子が該複合体の全身性投与後の哺乳動物で発現するか否か、及びそのレベルを決定する。いくつかの因子がDNA:脂質キャリア比を最適化するために重要である。従って、特定のDNA:脂質キャリア比が、用いられた異なる脂質キャリアサイズ毎と同様に、用いられた陽イオン性脂質のタイプ毎に必要である。用いられた脂質キャリア組成物毎に、最適化す

異なる結合部位を含み且つこれを吸収することができる細胞表面リセプターを用いて、伝統的なリセプター仲介エンドサイトシスによって細胞に取り込まれる(図7参照)。従って、試薬例えばサイトカイン、成長因子、他の可溶性タンパク質及び特定の薬剤を用いると、選択的にこれらの陽イオン結合リセプターをアップ又はダウンレギュレートすることが可能になる。適当な試薬によるアップ又はダウンレギュレーションの速度は、特定細胞のin vivo におけるトランスフェクションのレベルの上げ下げの選択を可能にする。更に驚くべきことに、裸のDNAに対する細胞表面リセプターは、哺乳動物宿主内の遺伝子導入発現における標的細胞特異性を、調節及び提供を共にするために用いられることができる。

プラスミドDNAに複合された、単及び多重ラメラ脂質キャリアのいずれかであるDOTMA脂質キャリアと、種々の細胞型(例えばCV-1サル腎臓細胞、U937ヒト骨髄単球白血病細胞、K562、MBL(マウス赤芽球白血病細胞)、ラット肺胞マクロファージ及び肺胞II型細胞)との最もよく起こる相互作用は、脂質キャリア付着及び吸収によるものである。この相互作用は、リセプター仲介エンドサイトシスのよく研究されている例には共通している。陽イオン性脂質キャリア:DNA複合体に接触するような全ての細胞が、形質膜に結合した後の複合体を摂取する。これらの細胞型の全てが、同一の伝統的リセプター仲介エンドサイトシス的な吸収経路を証明している。

哺乳動物宿主は、全ての動物、特に遺伝子関連疾患の症状を有する動物であり得る。従って、適用対象は、家畜、飼育動物例えばウシ、ヒツジ、ブタでも、寛量頻りにヒトでも使用される。哺乳動物宿主は妊娠され得、遺伝子関連治療の意図されたレシピエントは、妊娠したメス及び胎児のいずれか又は両方とし得る。本発明の方法では、in vivo トランスフェクションは、治療用転写又は発現ベクターを哺乳動物宿主へ、裸のDNA又は脂質キャリア特に陽イオン性脂質キャリアと複合されたDNAを導入することによって得られる。コンストラクトは、注入遺伝子の安定な維持又は注入遺伝子のエピソーム発現のために、宿主細胞ゲノムへ組み込むために提供され得る。哺乳動物宿主への導入はいくつかの経路全てによってされ得、これには、静脈又は腹腔注入、気管内的、鞘内的、腸管外的、動脈内的、筋肉内的等が含まれる。治療用発現ベクターの循環体液への導入が特

るため、DNAは、DNA:脂質キャリア複合体の凝集をもたらす比を決定するために、4:1から1:10(μgのDNA対nmolの陽イオン性脂質)の範囲となる、複数の異なる率で脂質キャリアと共に混合されるべきである。凝集をもたらす比は、in vivo では用いることができない。凝集をもたらさない比は、in vivo での最も高い注入遺伝子の発現レベルを確保するDNA:脂質キャリア比を決定するために、動物モデルにおいて試験される。例えば、DOTMA/DOP E、DDAB/DOPE、DOTAP/DOPE、DOTAP/Chol、LP E:CEBA、DDAB:Chol、L-PE:DOPE及びE-PC/CholにおけるSUVの最適DNA:脂質キャリア比は、各々、1:4、1:3、(全ての比でかなり低い活性)、1:6、1:1、1:5、2:1及び2:1である。DNA:脂質キャリア複合体は適当な生理学的溶液に作製されなければならない。DNA:脂質キャリア複合体は、それ自身DNA:脂質キャリア複合体の凝集を誘導しない生理溶液(約290ミリモル)に混合される。溶液は、水又は正常の生理塩水中5%のデキストロースを含む。

ベクター自身のコンストラクトも、またエアロゾル化投与若しくは全身性投与後に注入遺伝子のin vivo の高いレベルをもたらすために重要である。最適には、ベクターは、イントロンを欠く又は異所のスプライシングとならない拡張された5'イントロンを含む。更に、強力なプロモーターエンハンサー要素例えばHBMVのAD169株又は例えばSV40又はHCMVIEI遺伝子からの異種エンハンサーを弱いプロモーター例えばCFTR遺伝子へ付加することは、注入遺伝子の高いレベルのin vivo 発現を確保する。好適に構築されたベクターを用いると、高レベルのin vivo 発現は、ベクターのみの全身性注入後に、又はより効率的には陽イオン性脂質キャリアとの複合化された場合に得られ得る。更に、異種のエンハンサーとCFTRプロモーターとの使用は、CFTR遺伝子発現の内因性パターンに近づいた組織及び細胞型特異的様式で、有意な注入遺伝子発現をもたらすために用いられることができる。

陽イオン性脂質キャリアの細胞表面リセプターは、哺乳動物宿主における注入遺伝子発現の標的細胞特異性を、調節及び提供を共にするために用いられることができる。陽イオン性脂質キャリア:DNA複合体は、カチオン分子に対して特

に対象となる。従って、静脈投与及び気管内投与は、このような投与経路の後に広く拡散し得るのみ、特に対象となる。全て生理学的に許容可能な媒体がDNA又は脂質キャリアの投与のために用いられ得、これには、例えば脱イオン水、生理塩水、リン酸緩衝液、5%デキストロース水溶液等が含まれ、投与経路に依存する。他の成分がこの配合に含まれ得、例えば緩衝液、安定剤、殺生物剤等である。これらの成分は、文献に広範な例示が認められ、特にここでの説明の必要はない。

用いられる脂質キャリアの量は、DNA又は複合物が血流への侵入後、種々の組織への適当な散布がもたらされるため、及びトランスフェクトされた組織における治療的なレベルの発現をもたらすために、十分なものとす。治療レベルの発現は、宿主哺乳動物の疾患を処置又は緩和するために十分な量の発現である。更に、用いられるプラスミドDNA発現ベクターの量は、in vivo における複数の組織での有意なレベルの注入遺伝子発現をもたらすために十分なものとしなければならない。例えば、1mgの発現プラスミドのみは、マウスへ注入され、多数の組織においてCAT遺伝子の高レベル発現を達成する。他のDNA配列例えばアデノウイルスVA遺伝子は、投与媒体に含有されることができ、対象遺伝子と共にトランスフェクトされることができる。アデノウイルスVA遺伝子をコードする遺伝子の存在は、プラスミドから転写されたmRNAの翻訳を有意に促進し得る。

組み換え遺伝子の発現のレベル及び組織は、mRNAレベルで及び/又はポリペプチド若しくはタンパク質のレベルで測定され得る。遺伝子産物は、組織における生物活性を測定することによって定量され得る。例えば、酵素活性は、生物学的アッセイ又は、免疫染色技術例えば該遺伝子産物若しくは発現カセットに存在するリセプター遺伝子産物を特異的に認識する抗体を用いたプロービング(釣り上げ)によってトランスフェクトされた細胞中の遺伝子産物を同定することによって、測定されることができる。或いは、該遺伝子産物の潜在的治療効果は、例えば対象DNA配列がGM-CSFをコードする場合には、GM-CSF注入遺伝子が発現する致死量被曝動物の生き残りにおける遺伝子発現の効果を測定することによって、測定されることができる。注入遺伝子産物の有意量の生成は、こ

これらのマウスの生き残りを実質的に延長する。

ポリペプチド／タンパク質の発現又はmRNA自身さえも、宿主における変化した生化学的表現型を提供する場合、新しい表現型の出現又は古い表現型の損失を評価し得る；例えば宿主細胞のトランスフェクションの結果として、以前に不十分な量で生成されていた既存の所望産物の生成が増進され得、又は、アンチセンス、リボザイム又は共同抑制技術を用いて非所望遺伝子産物の減少又は更なる抑制が起こり得る；抑制の場合では、遺伝子産物の減少が測定され得る。普通、治療カセットは、宿主ゲノムへ組み込まれない。必要であれば、治療は、達成される結果に依存した目的に応じて、繰り返されることができる。治療が繰り返される場合、哺乳動物宿主は治療に対する不利な免疫応答がないことを確保するためにモニターされる。

本組成物は、1以上の複数の手法における使用に提供されることができる。キットには、裸のDNA及び脂質キャリアに複合されたDNAのいずれかとしてのDNAを通常含む。更に、提供されたDNAと複合させるための脂質キャリアが、別容器で提供され得る。直接注入及び脂質キャリアとの複合のいずれかのためのDNA又は脂質キャリア／DNA複合体は、使用前に更に希釈され得る濃縮物として存在し得、又は使用濃度で提供され得るが、この場合には1回以上の投与分のバイアルが含まれ得る。都合上、医師又は獣医師がシリンジを直接使い得るように、単一投与量がシリンジで提供され得、これは滅菌容器中に含まれている。ここで、該シリンジは所望の量及び濃度の試薬が入っている。従ってキットには、適正な比率の量のDNA又はDNA／脂質キャリア複合物を含む複数のシリンジが入っている。該シリンジが直接使用のための配合を含む場合、通常、本方法による使用の際に他の使用試薬を必要としない。

本発明は、多くの疾患のin vivo 治療及び／又は緩和に使用される。遺伝子のin vivo 置換は例えば相同組換え又は異常な遺伝子の初期ノックアウト及び次の所望注入遺伝子との置換の技術によって達成されることができる。

用途

本発明の用途を以下に挙げるが、これに限定されるものではない。本発明は、

84)、Methods in Enzymology(シリーズ)、Academic Press, Inc.; R. L. ロドリゲス(Rodriguez)ら編、Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses (1987)、Butterworths; 並びに、J. H. ミラー(Miller)ら、Experiments in Molecular Genetics (1972)、Cold Spring Harbor Laboratoryを参照。

我々は、INTOXチャンバを改変していない。48匹までのマウスを同時にエアロゾル投与量に晒すことができる。噴霧器中に配置されたDNA:リボソーム複合体溶液の全量の約0.02%を、各マウスの肺に実際に染み込ませる。

実施例1

in vivo 遺伝子治療のためのプラスミドの調製

哺乳細胞のトランスフェクションに用いられているプラスミドの詳細は下記に示す。

pRSVCAT: このプラスミドのコンストラクションは、ゴルマン(Gorman)ら、Proc. Natl. Acad. Sci., USA., (1982), 79:6777-6781に記載されている。このpRSVCATプラスミドには、3'-RSVLTRは、CATコーディング配列の上流にプロモータとして並置されている。LTR転写開始部位とCAT開始コードン(開始部位の下流の最初のAUG)との距離は約70bpである。

p5'PRL3-CAT: このプラスミドのコンストラクションは、サカイら、Genes and Development (1988) 2:1144-1154に記載されている。

pSIS-CAT: このプラスミドのコンストラクションは、ホエン及びゴルマン、Nucleic Acids Research (1990) 18:937-948に記載されている。

pZN20: このプラスミドのコンストラクションは、図3に説明されている。このプラスミドは下記のようにして調製した。pCATwt780(スティンスキ(Stinski)とロウアー(Roeher)、(1985) J. Virol., 55:431-441)をHindIIIで処理し、HCMV主体1E1エンハンサー及びプロモーター要素を含むフラグメントを精製した。その後、単離フラグメントを、pSP72(プロメガ)のHindIII部位へクローン化してpZN9を作製した。エンハンサー及びプロモーター要素が図3に示されているクローンをスクリーン(選抜)した。pZN9の部分

CFの複数器官系症状発現の予防及び／又は治療のために、肺へ及び適当な肺外組織へ実物を直接的に送達するのに特に有用である。特に、肺、肝臓、脾臓及び腸を含む組織におけるCFの疾患の症状発現の防止、治療及び治癒に有効である。

囊胞性繊維症の治療のために、機能性CFTR遺伝子又は野生型CFTR活性を有する分子をコードする核酸配列が投与される。該遺伝子は、この不全の防止及び／又は治療の両方のために、予防的に、また、該疾患の臨床発現に対応して、投与されることができる。本発明は、また肺を経た全身性循環への物質の送達において使用される。生成されるCFTRの量は、投与される量、投与の頻度及び期間、注入遺伝子の直接転写のために用いられるプロモーター及びエンハンサー要素の長さ、並びに、用いられる脂質キャリアの効率及び標的的特異性の変更によって制御されることができる。

本発明の方法は、アンチセンス治療でも利用できる。即ち、欠陥若しくは変異体CFTR遺伝子の相補的配列に特異的にハイブリッド可能なオリゴヌクレオチドを送り込み、それによってこれらの配列の転写及び／又は翻訳を阻止する。従って、特定の疾患の進行に必要なタンパク質をコードするDNA又はRNAを標的とし、その疾患の進行を妨げることができる。アンチセンス治療及びそこで有用なオリゴヌクレオチドについては、E. ウルマン(Uhlmann)及びA. ペイマン(Peyman)、Chem. Rev. (1990) 90:543-584を参照。

以下に、実施例は説明を目的として挙げたもので、本発明の範囲をこれらに限定するものではない。

実施例

本発明の具体化では、特記のない限りは、細胞培養、分子生物学、微生物学、組換えDNA及び免疫学の従来からの技術を用いており、その分野の技術の範囲内である。これらの技術については、文献に詳しい説明がある。例えば、サムブルック(Sambrook)ら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition (1989) Vols. 1-3; D. N. グローバー(Glover)編、DNA Cloning (1985) Vols. I and II; B. Dヘイムズ(Hames)ら編、Nucleic Acid Hybridization (1984); B. パーバル(Pertal)、A Practical Guide to Molecular Cloning (19

HindIII消化の後、平滑末端にDNAポリメラーゼIクレノウフラグメントを追加した。得られたクローンpZN12は、エンハンサー及びプロモーター要素の5'のHindIII部位を失っていた。その後pZN12をNcoI及びHindIIIで処理し、大きいNcoI-HindIIIフラグメントを精製し、pBC12/CMV/I L-2(クーレン(Cullen)、Cell (1986) 46:973-982)由来の精製された小さいNcoI-HindIIIフラグメントに連結した(ライゲーション)。pBC12/CMV/I L-2はAD168株由来のHCMVプロモーターを含む。得られたクローンをpZN13とした。pZN13をBamHIで部分消化し、DNAポリメラーゼIクレノウフラグメントを追加し、得られたクローンをエンハンサー及びプロモーター要素の5'末端でBamHI部位を失っているクローンをスクリーンした。得られたクローンをpZN17と呼んだ。pZN17をHindIII及びBamHIで処理し、得られたHindIII-BamHI大フラグメントを精製し、pSV2-CAT(ゴルマンら、(1982) Molecular Cell Biology, 2:1044-1051)から得られた精製された小HindIII-BamHIフラグメントと連結した。得られたクローンをpZN20とした。HCMV(Towne)の全長制限地図は図19Aに示されている。HCMV(AD169)は図19Cに示されている。2つのプロモーターの比較は図19Bに示されている。Towne株由来のものと比較した場合に、実質的に高い発現はAD169株由来のプロモーターを用いた際に得られる。pZN20はNcoI部位の5'側にTowneの配列とNcoI部位の3'側にAD169の配列とを有する複合プロモーターを含む。NcoI部位は、図19Bでアスタリスクによって表示されている。pZN20はこの複合HCMVプロモーターと、その後CAT遺伝子、SV40のターミントロン及びSV40のポリA付加部位とを有する。

pZN27: このプラスミドのコンストラクトは図7に説明されている。pZN27は複合HCMVプロモーターとその後にSV40のターミントロン、CATコーディング配列及びSV40のポリA付加部位を、この順で有する。

pZN48: このプラスミドのコンストラクトは図27A及び図27Bに説明されている。pZN48は、複合HCMVプロモーターとその後にヒトIL-2遺伝子、ラットのプレプロインシュリン2イントロン及びラットプレプロインシ

ユリン2遺伝子由来のポリA付加部位を含む。これらの最後の3つの成分は、クレーン (Cell 46:973-982 (1986)) のpBC12/CMV/1L-2プラスミド由来であった。ラットプレプロインシュリン2イントロンは、内部の162bp NdeIフラグメントを欠損することによって改変された。

pZN32: このプラスミドのコンストラクトは図10に説明されている。pZN32は、複合HCMVプロモーターと、その後pZN46で説明されたラットの改変プレプロインシュリン2イントロン、CFTRのcDNA及びpZN46で説明されたプレプロインシュリン2遺伝子ポリA付加部位を含む。CFTRのcDNAは、F. コリンズ(Collins)(シンガン大学)から供与されたpBQ4.7から得られた。

pZN51: このプラスミドのコンストラクトは図11に説明されている。pZN51は、複合HCMVプロモーターとその後CATコーディング配列及びSV40ポリA部位を含む。

pZN60, pZN61, pZN62, pZN63: これらのプラスミドは図19に示されている。pZN60はHCMV複合プロモーターと、その後改変されたラットプレプロインシュリン2イントロン、CATコーディング配列及びSV40ポリA付加部位を含む。pZN61はpZN60と同一であるが、イントロンの5'側に166bpの付加を含む。この付加DNAはpBC12/CMV/1L-2プラスミド中のイントロンのすぐ5'側の166bpであり、ラットプレプロインシュリン2遺伝子コーディング配列を含み得る。pZN62は、イントロンがpZN60における5'よりはむしろCATコーディング配列の3'側のものである以外はpZN60と類似している。pZN63はイントロンの5'側の166bpの付加を除いてpZN62と同一である。これはpZN61で記述されたものと同一の付加配列である。

実施例2

脂質キャリアー-核酸複合体のエアロゾル化送達後のげっ歯類の肺における
クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)遺伝子の発現
脂質キャリアーとして使用されたのは、プラスミドpRSV-CAT(ゴルマン

(1990) 18:937-947)に述べる方法に従って作製したが、そこではプラスミドpM1.1. CATはSV40プロモーターを使っているのに対して、CMVプロモーター及びハイブリッドイントロン配列を用いた点が例外である。要約すると、CAT脂質キャリアーは、まず最初にCMVプロモーターを含有するpM1主体のプラスミドを作製し、その直後にアデノウィルスメジャー後期(AML)領域からの5'側末端翻訳リーダーの部分が続く。この領域には、三部分(tripartite)リーダーの最初のエクソンの初めの13のヌクレオチドと、AML領域からの介在配列(IVS)の部分を除くすべての部分が入っていた。合成オリゴヌクレオチドを挿入し、1gC可変領域の機能的スプライス受容配列を得るために、それをアデノウィルスのイントロンと合併した。ボズウェル(Bothwell)ら、Cell (1981) 24:625-637参照。このプラスミドをイントロンの境界となる2つの制限部位(ClaI及びPstI)で切断して、282bpのフラグメントを取り出した。適合する合成オリゴヌクレオチド・リンカーを挿入した。このプラスミドを、pCIS-CATと名付けた。

pCIS-CATを使ってCAT遺伝子の発現について試験するために、12mgのpCIS-CATを24μmolのDOTMA/DOPE(1:1)と混ぜた。ICRメスマウスを、異なる3つのエアロゾル受容チャンバに入れた。全てのマウスにも、先に述べた方法でリポソームに複合させたCAT発現プラスミドを同量ずつ投与した。動物1〜3は、イントックス設計のエアロゾルチャンバでエアロゾルに曝露させた。動物4〜7は、個々のマウスを分ける仕切り付きの改良ラットケージでエアロゾルに曝露させた。動物8〜10は、イントックスチャンバで使われた拘束装置に入れた後で、似ているがより小さい改良マウスケージに入れた。エアロゾル曝露の48時間後に、動物を犠牲死させて、全肺についてクロマトグラフィーCATアッセイを使ってCAT発現をアッセイした。図21に示すように、単一エアロゾル投与量の陽イオン性リポソームに複合させたCAT遺伝子発現プラスミドは、マウスの肺に高レベルの注入遺伝子発現をもたらすことができる。マウスが吸入するエアロゾルの量を最大限にするように作られているイントックス鼻曝露装置中のエアロゾルミストに曝露した7匹のマウス全部(動物番号1〜3及び8〜10)の肺に、有意なレベルの注入遺伝子発現が見られ

ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982) 79:6777-6781; ヨング及びゴルマン、Mol. Cell. Biol. (1990) 10:1805-1810)と、RSVの最終結反復により生じるCAT遺伝子を含有するプラスミドと、pRSV-β-galプラスミド(ハジンスキーら、Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. (1991) 4:206-208)である。

pRSV-CATプラスミドをリポソームに複合させ、下記の手順で体重25gのメスBalb/cマウスに投与した。pRSV-CAT 2mgを、リン酸塩緩衝食塩水中のDOTMA(GIBCO BRL, グランドアイランド、ニューヨーク州)/コレステロール(2:1)小さな単ラメラリポソーム4μmolと混ぜてから、Acorn I 噴霧器(マルケスト・メディカル・プロダクツ社、インゲルウッド、コロラド州)を使って、イントックス鼻曝露チャンバ(イントックス・プロダクツ、アルバカーキ、ニューメキシコ州)に入れたラット又はマウスの群に噴霧した。0.5mgのpRSV-CATを1.0μmolのDOTMA-コレステロール(2:1)と混合したもの、また2.0mgのpRSV-CAT単独についても同様の手順を実施した。2ないし5日後に、動物を犠牲死させ、肺を採取した。未処理の対照群からも肺を採取した。肺はホモジナイズし、細胞を3回の凍結融解サイクルで破壊した。肺抽出物の一部のCAT活性を、ウォルブラ、Science (1980) 247:1465-1468による標準的なアッセイを用いて測定した。

結果

図20を見てわかるように、2.0mgのRSV-CATと4.0μmol DOTMA/コレステロール(2:1)とを投与された動物ではCATタンパク質が発現したのに対して、対照動物ならびにRSV-CAT DNAのみ投与、もしくは低用量のpRSV-CAT:DOTMA:コレステロール複合体の投与を受けた動物では発現は見られなかった。pRSV-β-galを、5.0mgのpRSV-β-galに5.0μmolのDOTMA/コレステロール(2:1)と混合するという以外、まったく同様の手続を行った。β-gal活性の有無については、標準的な組織化学的染色方法により調べた。曝露されたラットの気道上皮細胞にβ-gal活性が認められた。

CMVプロモーターによるCAT遺伝子を含有するプラスミドについても試験した。このプラスミドは、M. T. F. ホン及びC. M. ゴルマン、Nuc. Acids Res.

る。ここで見られる量の変動は、他のエアロゾル実験で見られるものに匹敵し、エアロゾルミストへの曝露の変動、鼻通過効率の個体間の差等によって説明できる。

実施例2

脂質キャリアーと脂質キャリアーに複合するDNAとの調製

陽イオン性脂質例えば[N(1-2-3-ジオレイルオキシ)プロピル]-N,N,N-トリエチルアンモニウム(DOTMA)、ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロマイド(DDAB)又は1,2-ジオレイルオキシ-3-(トリメチルアンモニオ)プロパン(DOTAP)又はリシニール-ホスファチジルエタノールアミンと、第2脂質例えばジオイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)又はコレステロールとを含む脂質キャリアーが下記のように調製された。

脂質キャリアーの調製

脂質例えば、DDAB、L-リシニール-ホスファチジルエタノールアミン(L-PE)、E-PC、E-DMPC、コレステロール-エステル-β-アラニン(CEBA)、DOTAPと、コレステロール(Chol)とを、クロロホルムに溶解した。各脂質の好適な量(最終脂質キャリアー配合物における各脂質の希望のモル比によって規定され、通常1対1モルの陽イオン性脂質対非陽イオン性脂質であるが、5〜1対1〜5の範囲を探る)を共に混合して、回転式蒸発器によって乾燥するまで蒸発させた。その後、該脂質フィルムを、水又は脂質キャリアー緩衝液(25mMのトリス-HCl、pH7.4、100μMのZnCl₂、等張液)中5%のデキストロースを付加した後にボルテックス処理によって再懸濁し、最終濃度20mMの多重ラメラ小胞(MLV)を作製した。小さい単ラメラ小胞の調製には、その後、この混合物を音波粉砕槽中で15分間、音波粉砕し、脂質キャリアーを使用まで4℃アルゴン下で保存した。

プラスミド調製:

プラスミドを運ぶE. coli株を37℃でTBにおいて育成させた。プラスミド精製方法は、サムブロックら(Molecular Cloning, 第2版, 1989, コールド

スプリングハーバーラボラトリー(社)によって記述されている“アルカリ溶解”及び“ポリエチレングリコールを用いた沈殿によるプラスミドDNAの精製”の改良手法とする。この改良はPEGによるDNAの沈殿を省いていることである。最終DNA調製物は、10 mMのTris-HCl pH 8.0に溶解した。

脂質キャリアープラスミド複合体の調製

プラスミドを所望の濃度(通常、 $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$)に5%デキストロース水溶液に別途希釈した。脂質キャリアーもプラスミドと同一の容量に5%デキストロース水に希釈した。

使用される脂質キャリアーの量は、リポソーム脂質モル対添加プラスミド μg の比に基づいて規定され、例えば脂質キャリアー:プラスミド=1:1であり、1ミリの陽イオン性脂質を1 μg のプラスミドDNAと混合した。その後、プラスミドと脂質キャリアーとを共に混合してDNA:脂質キャリアー複合体を形成した。**投与量注入**。少なくとも50 μg であり、規則的には陽イオン性脂質キャリアーに混合されたプラスミドDNA 100 μg をマウス当りに注入した。プラスミドのみの注入には、少なくとも500 μg 及び規則的には2 mgのプラスミドDNAをマウス当りに尾静脈によって注入した。

実施例3

p ZN 27-DDAB:コレステロール脂質キャリアー複合体の

静脈(i.v.)注入後の肺におけるCAT遺伝子発現の免疫組織化学による証明

脂質キャリアー: DDAB:Chol=1:1、脂質キャリアー緩衝液中20 mMで保存。

プラスミド: p ZN 27

DNA:脂質キャリアー比: 脂質キャリアー:プラスミド=5 nmol陽イオン性脂質:1 μg DNA

DNA投与量: 5%デキストロース水溶液200 μl 中100 μg プラスミド

in vivo CAT遺伝子発現のレベルのよるip注入されたp ZN 20-陽イオン性脂質キャリアー複合体の量の効果

メスICRマウス(シモンソンラボ、ゲルロイ、カリフォルニア州)は、0.01、0.1、1 μmol のDDAB:DOPE脂質キャリアーに複合された各々0.01、0.1、1 mgのp ZN 20発現プラスミドを含む5%デキストロース水溶液1 mlで、腹腔注入された。マウスを48時間後の犠牲死させ、器官を摘出してハンドヘルドのホモジナイザーを用いて組織を0.25 Mのトリス-HCl緩衝液pH 7.8中でホモジナイズした。細胞抽出物を作製しタンパク質含量で基準化して、その後CATタンパク質のレベルを測定した。実験は3匹を1群とし、結果はアセチルクロラムフェニコールの平均dpm \pm SEMで表す。

方法: DDABを含む脂質キャリアーをDOPEに対して1:1モル比に下記のようにして調製した:クロロホルム溶解DOPE 10 μmol とエタノール溶解陽イオン性脂質10 μmol とを回転式蒸発器で乾燥まで蒸発させた。滅菌水1 mlを添加して、混合物を音波粉砕槽(ラボラトリー・サブライズ社、ヒックスビル、ニューヨーク州)中で20分間音波粉砕した。脂質キャリアーは約100 \pm 25 nmの平均径を有していた。CATアッセイのための、細胞抽出物を作製し、そのタンパク質含量を、クマジーブルーアッセイ(バイオラッド社、リッチモンド、カリフォルニア州)によって測定した。肺、脾臓、肝臓及び心臓抽出物からの100 μg 及びリンパ節抽出物からの50 μg のタンパク質を、前述(ゴルマン、前出)のように、 ^{14}C 標識化クロラムフェニコールと反応させて、クロマトグラフィーにかけた。dpmの算出のため、アセチル化物と非アセチル化物とを共にTLCプレートから切り出し、シンチレーションカウンタで放射物活性を計測した。アセチル化物及び非アセチル化物のカウントとの間の割合は、平均dpmの算出の用いられた。未処理対照動物の組織からの平均dpmを、各組織からの各処理動物から引算した。

結果: in vivoでの潜在的投与量反応性相関を評価するために、1群につき3匹の動物に、0.01 μmol 、0.1 μmol 又は1 μmol のDDAB:DOPE脂質キャリアーに複合された各々0.01 mg、0.1 mg又は1 mgのp ZN 20プラスミドを注入した。0.1 mg及び1 mg DNA投与量は共に、アッセイされた

DNAをマウス当たり尾静脈からivで注入した。

マウス: ICR、メス、25 g。

in vivo 処理したマウスの肺切片における

CATタンパク質を検出するための免疫組織化学染色

方法: p ZN 27-DDAB:Chol複合体の注入後48時間で、肺を取り出し、33%のOCTで選流し、OCTで包埋してスナップ凍結した。凍結組織は、6 μm で切り、ガラススライド上へ回収して4 $^{\circ}\text{C}$ アセトンで10分間固定して、その後0.2%Triton X-100中に配置して膜を透過性にした。その後、切片を12~48時間、適当な希釈率でモノクローナル抗CAT抗体(アリゾナ大学のパーカー・アンティン(Parker Antin)博士から供与された)又はネガティブ対照用アイソタイプ抗体と共にインキュベートした。洗浄後、1)一次抗体に直接対するビオチン化抗体(ザイメッド社、サンフランシスコ)を60分間作用させ、2)その後、ストレプトアビジン-アルカリホスファターゼ複合物(ザイメッド社)を60分間作用させし、3)製造社の取扱書による酵素標識に好適な基質色素源の作用を行った。その後、スライドを検査のために水性マウント用媒体へオーバーライドさせた。

結果: 結果を図2A及び2Bに示し、肺の核酸染色を証明する。染色は肺胞壁に局在し、このことは、肺胞管壁細胞と共に、I型及びII型細胞並びに肺泡マクロファージを含めて70%を超える肺血管上皮細胞がDNA脂質キャリアー複合体の単回iv注入によってトランスフェクトされることを示す。更に、有意な数の細気管支気道管壁細胞が、CATタンパク質に対してポジティブに染色し、従って、脂質キャリアー:DNA複合体のiv注入によってin vivoでトランスフェクトされた。従って、肺の大多數の細胞がp ZN 27-DDAB:Chol複合体のiv注入によってトランスフェクトされた。

実施例4

腹腔投与後のp ZN 20の発現

全て器官において高い有意なレベル($p < 0.005$)のCATタンパク質をもたらした。各器官におけるCAT遺伝子発現の最高レベルは1 mg DNA投与量でもたらされ、DNA-脂質キャリアー量の10倍増加は、リンパ節CATレベルを約2倍増加させ、脾臓では3倍増加させた。1 mgのp ZN 20プラスミドのみの腹腔注入は、バックグラウンドレベルを超える検出可能なCATタンパク質をもたらさなかった。

実施例5

p 5' PRL3-CAT:L-PE:CEBA複合体の

静脈(i.v.)注入後の脾臓におけるCAT遺伝子発現の証明

脂質キャリアー: L-PE:CEBA=1:1、脂質キャリアー緩衝液に20 mMで保存。

プラスミド: p 5' PRL3-CAT

DNA:脂質キャリアー比: 脂質キャリアー:プラスミド=1 nmol陽イオン性脂質:1 μg プラスミドDNA

DNA投与量: 5%デキストロース水溶液200 μl 中200 μg プラスミドDNAをマウス当たり尾静脈から注入した。

マウス: Balb/c、メス、25 g

組織抽出手順: 尾静脈注入後48時間で、マウスを犠牲死させ、全脾臓を1 mlの0.25 Mのトリス-HCl pH 7.8、5 mMのEDTA、80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のPMSF中にホモジナイズして、得られた抽出物を速心分離し、その後上清をサイクルの凍結-解凍操作の付し、その後20分間65 $^{\circ}\text{C}$ に加熱した。

CATアッセイ手順: 100 μl の抽出物+10 μl の20 mMアセチルCoA+4 μl の ^{14}C -クロラムフェニコール(25 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ 、55 mCi/mmol、アマシャム社)と共に、37 $^{\circ}\text{C}$ 6時間でインキュベートした。3時間で、更に100 μl のアセチルCoAを添加した。

結果: レーン2(脂質キャリアーのみ)及びレーン5(脂質キャリアー-DNA複合物)に結果を示し、これは有意なレベルのCAT活性が処理動物の脾臓抽出物

にあるが、脂質キャリアのみで注入された動物から得られた対照脾臓の抽出物にはないことを表している。

pRSV-CAT: L-PE: CEBA 複合体の静脈 (i.v.) 注入後の脾におけるCAT遺伝子発現の証明

脂質キャリア: L-PE: CEBA = 1 : 1、脂質キャリア緩衝液に20 mMで保存。

プラスミド: pRSV-CAT

DNA: 脂質キャリア比: 脂質キャリア: プラスミド = 1 nmol陽イオン性脂質: 1 μ g プラスミドDNA

DNA投与量: 5%デキストロース水溶液200 μ l中に100 μ g プラスミドDNAをマウス当たり尾静脈から注入した。

マウス: Balb/c、メス、25 g

組織摘出手順: 尾静脈注入後48時間で、マウスを犠牲死させ、全肺を1 mlの0.25 Mのトリス-HCl、pH 7.8、5 mMのEDTA、80 μ g/mlのPMSF中にホモジナイズして、得られた抽出物を遠心分離し、その後上清を3サイクルの凍結-解凍操作に付し、その後20分間85℃に加熱した。

CATアッセイ手順: 100 μ lの抽出物+10 μ lの20 mMアセチルCoA+4 μ lの¹⁴C-クロロムフェニコール (25 μ Ci/ml、55 mCi/mmol、アマシャム社)を共に、37℃6時間でインキュベートした。3時間で、更に10 μ lのアセチルCoAを添加した。

結果:

結果は図9に示され、これは有意なレベルのCAT活性(注入遺伝子の発現の表示)が脂質キャリア: DNA複合体を注入された動物の脾にある(レーン5)が、対照動物からの脾にはない(レーン1~4)ことを表している。

pZN20: DDAB: DOPE 複合体の静脈 (i.v.) 注入後の複数組織におけるCAT遺伝子発現の証明

の配合であるSUV脂質キャリアと、同程度又はより高いレベルのin vivo 注入遺伝子発現を仲介する。

pZN20のみの静脈 (i.v.) 注入後のin vivo でのCAT遺伝子発現の証明

プラスミド: pZN20

DNA: 脂質キャリア比: プラスミドDNAのみで、脂質キャリアを伴うことなく、注入した。

DNA投与量: 5%デキストロース水溶液200 μ l中に300 μ g プラスミドDNAをマウス当たり尾静脈から注入した。

マウス: 1CR、メス、25 g

組織摘出手順: 各組織を0.3 mlの0.25 Mのトリス-HCl、pH 7.8、5 mMのEDTA中にホモジナイズして、得られた抽出物を遠心分離し、その後上清を3サイクルの凍結-解凍操作に付し、その後20分間85℃に加熱した。

CATアッセイ手順: 各組織抽出物のタンパク質濃度をニンヒドリン主体タンパク質アッセイ(バイオラッド社、リッチモンド、カリフォルニア州)を用いて定量化し、各組織抽出物からの同一量の全タンパク質を、37℃13時間で10 μ lの20 mMアセチルCoA+12 μ lの¹⁴C-クロロムフェニコール (25 μ Ci/ml、55 mCi/mmol、アマシャム社)と共に、CATアッセイに加えた。

実施例6

DOTMA: DOPE+pSIS-CATプラスミドの注入は明らかに検出可能なin vivo におけるCAT遺伝子の発現をもたらさない

脂質キャリア: DOTMA: DOPE = 1 : 1、5%デキストロース水溶液中
プラスミド: pSIS-CAT (ハン、M.T.F.及びC.M.ゴルマン、

1990, Nucleic Acids Research 18:937-947)

るCAT遺伝子発現の証明

脂質キャリア: DDAB: DOPE = 1 : 1、5%デキストロースに10 mMで保存。

プラスミド: pZN20

DNA: 脂質キャリア比:

脂質キャリア: プラスミド = (A) 3 nmol陽イオン性脂質: 1 μ g プラスミドDNA (SUV); (B) 6 nmol陽イオン性脂質: 1 μ g プラスミドDNA (MLV)

DNA投与量:

5%デキストロース水溶液200 μ l中に100 μ g プラスミドDNAをマウス当たり尾静脈から注入した。3匹のマウス各々がこの量のMLV: pZN20を受け、3匹のマウス各々がこの量のSUV: pZN20を受けた。

組織摘出手順:

各組織を0.3 mlの0.25 Mのトリス-HCl、pH 7.8、5 mMのEDTA中にホモジナイズして、得られた抽出物を遠心分離し、その後上清を3サイクルの凍結-解凍操作に付し、その後20分間85℃に加熱した。

CATアッセイ手順:

各組織抽出物のタンパク質の濃度をクマジーブルー-主体タンパク質アッセイ(バイオラッド社、リッチモンド、カリフォルニア州)により定量化し、各組織抽出物からの同一量の全タンパク質を、37℃13時間で10 μ lの20 mMアセチルCoA+12 μ lの¹⁴C-クロロムフェニコール (25 μ Ci/ml、55 mCi/mmol、アマシャム社)と共にCATアッセイに加えた。

結果:

結果は図5に示され、これはpZN2: DDAB: DOPE複合体のi.v.注入の、肺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓及びリンパ節を含む6の異なる組織における有意なレベルのCAT遺伝子発現を示す。更に、MLV脂質キャリアは、同一脂質

比: 陽イオン性脂質: プラスミド = 4 nmol: 1 μ g、投与量: 200 μ lの5%デキストロース水溶液中100 μ g DNA

マウス: 1CR、メス、25 g

注入: 尾静脈

組織採取及び加工処理:

マウスを2日目及び6日目で犠牲死にして、肺、脾臓、肝臓及び心臓を採取した。肝臓を除く全器官は0.5 mlの、肝臓は2.0 mlの、0.25 Mのトリス-HCl、pH 7.8、5 mMのEDTA、2 μ g/mlのアプロチニン、1 μ g/mlのE-64及び0.5 μ g/mlのロイペプチン(全プロテアーゼ阻害剤はペーリンガー・マンハイム社から購入)中にホモジナイズした。抽出物を3サイクルの凍結-解凍操作に付し、その後10分間85℃に加熱した。

CATアッセイ手順:

アッセイのための抽出物100 μ lと0.3 μ Ciの¹⁴C-クロロムフェニコール及び10 μ lの20 mMアセチルCoAとを37℃で5時間及び24.5時間のいずれかでインキュベートし、その後、該物質をエチルアセテートを用いて抽出し、TLCプレート上で解析した。

結果: 処理動物からの抽出物を対照動物からのものとを比較することによって測定した場合に、アセチルクロロムフェニコールは認められなかった。従って、高レベルのpZN27の発現がもたらされるものと同様の実験上の条件下でのpSIS-CAT発現ベクターの使用は、in vivo でアッセイされた全ての組織における検出可能な連結CAT遺伝子の如何なる発現も生じ得ない。in vivo でのpSIS-CATの発現の欠落は、高レベルのin vivo 発現を発揮するpZN27ベクターと比較した場合に、異なるプロモーター-エンハンサー要素(SV40)のためか、異なるイントロン配列のためかであろう。

結果を図6に示す。

実施例7

DNA：脂質キャリア複合物と細胞表面リセプターとの相互作用

細胞及び細胞培養： CV-1（アフリカグリーン猿、肝臓）、U937（ヒト、骨髄性白血病）、マウス赤白血病（MEL）細胞、及びK562細胞（ヒト、赤白血病細胞）をアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（ロックビル、メリーランド州）から得た。CV-1及びMEL細胞を、5%ウシ胎児血清（FBS）添加ダルベッコ最少必須培地（DME）-H21中、37℃及び7%CO₂で維持した。ラット肺II型細胞及びラット肺マクロファージを記述されたように単離して精製した（デブス(Debs)ら、*Amer. Rev. Respiratory Disease* (1987) 135:731-737；ドブス(Dobbs), L., *Amer. Rev. Respiratory Disease* (1986) 134:141-145)。II型細胞を5%FBS添加DME-H16中、37℃及び7%CO₂で維持した。20nmolのDOTMA：DOPE脂質キャリアと20μgのpRSV-CATプラスミドDNAとの複合物を、60mmファルコンプラスチックディッシュ中で成長している2×10⁶細胞に添加して（SUV及びMLVのいずれか）、その後15分から2時間の時点でのEMのために固定した。

電子顕微鏡のための固定及び処理

DOTMA脂質キャリアと組織培養中の又は血液若しくは肺から新たに単離した細胞とを、1%シュクロース含有0.1モルカコジル酸ナトリウム緩衝液pH7.4中の1.5%グルタルアルデヒドに、1時間室温で固定した。タンニン酸及びウラニルアセテート増加の後、組織をアルコールの段階シリーズ中で脱水し、エポキシ812樹脂（アーネスト・F. フラム(Ernest F. Fullam) インク社、ラザム、ニューヨーク州）に包埋し、ダイヤモンドナイフを用いてMT2ミクロームにおいて切片を作製し、80kVで撮写したジョエル100CX透過型電子顕微鏡で試験した。結果を図4に示す。

結果

プラスミドDNAに複合した単一及び多重ラメラ脂質キャリアのいずれかのDOTMA脂質キャリアと種々の細胞型（CV-1サル腺癌細胞、U937ヒト骨髄球白血病細胞、K562、MEL赤芽球白血病細胞、ラット肺マクロファージ及びII型肺細胞）との高頻度相互作用は、脂質キャリア付着と典型的な液

状中にホモジナイズして、得られた抽出物を遠心分離し、その後上清を3サイクルの凍結-解凍操作に付し、その後20分間65℃に加熱した。

CATアッセイ手順：

各組織抽出物のタンパク質濃度を、クマジーブルー主体タンパク質アッセイ（バイオラッド社、リッチモンド、カリフォルニア州）を用いて定量し、各組織抽出物からの同一量の金タンパク質を、37℃13時間で10μlの20mMアセチルCoA+12μlの¹⁴C-クロラムフェニコール（25μCi/ml、55mCi/mmole、アマシャム社）と共に、CATアッセイに加えた。

結果：

結果は図8に示されている。有意なレベルのCAT活性が、pZN27のみ及びDDAB：コレステロール脂質キャリアに複合されたpZN27のいずれかの注入後にアッセイされた6つの異なる組織（肺、心臓、肝臓、腎臓、私蔵及びリンパ節）各々に認められた。裸の発現プラスミドの全身性注入後にin vivoでの複数組織における注入遺伝子の発現は、以前に証明されていない。

実施例8DDAB：コレステロールリポソーム-pZN32複合体の

エアロゾル投与後のマウス肺におけるヒトCFTR遺伝子の高レベル気道発現 シモンセン(Simonsen)(ジロイ、カリフォルニア州)から入手した2カ月齢のメスICRマウス。

プラスミドDNAの調製

使用したプラスミドリポソームpZN32には、添付の図3～5に示したヒトサイトメガロウィルス前初期プロモーター-エンハンサー要素に融合されたヒトCFTR遺伝子コーディング領域が含まれている。HCMV(Towne)及びHCMV(AD169)の前初期エンハンサー及びプロモーター領域の完全制限地図は、図18A及び18Cに載っている。2つの配列を、図18Bで比較している。pZN32は、アルカリ溶解及び酢酸アンモニウム沈殿を使って精製し、

微小胞経路における吸収のものである(図4a-f)。この相互作用は、リセプター伸介エンドサイトシスのよく研究された例に共通しているものである。陽イオン性脂質キャリア：DNA複合物と接触するように見える全ての細胞は、形質膜への結合後に該複合物を取り込む。これらの全ての細胞型は、同一の吸収の伝統的リセプター伸介エンドサイトシス経路を証明する。ヒト細胞は他の細胞例えばマウス細胞よりも、より効率よくトランスフェクトされる。

実施例6pZN27のみ又はpZN27：DDAB：コレステロールSUV複合体の静脈(IV)注入後の複数組織における高レベルのCAT遺伝子発現の証明脂質キャリア：

DDAB：Chol=1：1、5%デキストロース中10mMで保存。乾燥脂質フィルムへの5%デキストロース添加後、SUVを音波粉砕槽において20分開音波処理して調製した。

プラスミド： pZN27DNA：脂質キャリア割合：

陽イオン性脂質：プラスミドDNA=5nmol：1μgDNA

DNA投与量：

pZN27のみ：各マウスは500μg、1mg、2mg又は500μgを及び、4時間後に第2の500μg投与量で、各々、尾静脈注入によって5%デキストロース200μl中のpZN27を受けた。

脂質キャリアに複合されたpZN27：5%デキストロース水溶液200μl中の、DDAB：Chol SUV脂質キャリア500nmolに複合された100μgプラスミドDNAをマウス当たり尾静脈から注入した。

マウス：ICR、メス、25g

組織抽出手順：

各器官を0.3mlの0.25Mのトリス-HCl、pH7.8、5mMのED

タ酸濃度は280nmで紫外線吸収により測定した。

陽イオン性脂質キャリアの調製

脂質キャリアは、陽イオン性脂質DDAB（ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロマイド）をDDABコレステロールとして1：1のモル比で含有する小さな単ラメラ小胞（直径約100nm）として調製した。DDABはシグマ（セントルイス、ミズーリ州）から、コレステロールはカルバイオケム（サンディエゴ、カルフォルニア州）から購入した。脂質の原液をクロロホルムに溶解した。脂質を九底プラスチック中で混合し、減圧下で回転式蒸発器上で蒸発乾燥させた。二重蒸留水を加えて、最終脂質濃度がそれぞれ10mMになるようにし、できあがった混合液を音波処理槽（ラボラトリー・サブライズ、ヒックスビル、ニューヨーク州）で約20分開音波処理した。

プラスミド/脂質キャリア複合体のマウスへのエアロゾル化送達

DDAB：コレステロール（モル比1：1）リポソーム24μmolにpZN32 12mgを複合させて、同日の異なる時間に2回、エアロゾル投与した。逆に荷電している成分が凝集し沈殿するのを防ぐために、リポソームとDNAとは混合する前に滅菌水でそれぞれ別に希釈した。プラスミドDNA 6mgとDDAB：コレステロール（モル比1：1）リポソーム12μmolとを、それぞれ水で8mlに希釈してから混ぜた。それから2台のAcora1噴霧器（マルゲスト、イングルウッド、コロラド州）にそれぞれ、4mlのDNA/リポソーム混合物を入れ、動物をイントックス小動物曝露チャンバ（アルバカーキ、ニューメキシコ州）に入れた。気流速4ℓ/分でエアロゾルを発生させた。この容量（4ml）のDNA-リポソーム混合物をエアロゾルにするのに約80分かかった。動物を曝露チャンバから1～2時間取り出してから、もう一度同じ手順を2回目の4ml投与量で繰り返した。

マウス肺におけるヒトCFTRタンパク質の免疫組織化学的染色

エアロゾル曝露後の一定の時点で、マウスを犠牲死させ、直ちに肺を取り出した。3、3容量%のOCT（ミルズ・インク）を含有するリン酸緩衝食塩水（PBS）で肺をゆっくりと浸潤させ、OCTで満たした組織カセットに入れて、ドライアイス/エタノール槽で冷却した2-メチルブタンで凍結させた。5μmに切

った凍結切片を塩処理したスライド上に採取した。凍結切片を、0.1% Tween 20 含有PBS (PBST) 中の4%アセトン又は2%パラホルムアルデヒドで10分間固定した後、CFTRタンパク質を検出した。その後の希釈及び洗浄はすべてPBST中で行った。固定後、切片をPBSTで3回洗浄(それぞれ5分間)してから、10%正常ウサギ血清で20℃で10分間置いた。アフィニティ精製したウサギポリクローナル抗CFTR抗体、 α -1468 (ジョナサン・コーン(Jonathan Co hn) 博士(デューク大学)から提供された)を使って、CFTRの免疫局在化を行った。血清を、希釈(1:1000)した α -1468で置換した。抗体被覆切片に更にシリコン化カバースライドをそっと載せて、4℃の湿潤チャンバ中で24時間インキュベートした。その後スライドを20℃まで加温し、3回洗浄した。ビオチン化シアフィニティ精製したヤギ抗ウサギ抗体(リビド・キャリア・ラボラトリー)を1:300に希釈したもので切片を1時間置き、その後洗浄して(10分ずつ3回)、アルカリホスファターゼで標識化したストレプトアビジン(ザイメッド、南サンフランシスコ)で20分間置換して、CFTRに対するウサギ抗体との結合の有無を調べた。AP-レッド(ザイメッド)を色素源として用いて固定化したアルカリホスファターゼを検出した。内在アルカリホスファターゼはレバミゾール(ザイメッド)で阻止された; この他に同時に行った対照物としては、一次抗体の代わりに正常ウサギ血清を使うこと、未処理マウスからの肺組織を使うことがあった。コダック・エクタクロム64TフィルムX50及びX250を使って、顕微鏡写真を撮った。

結果

pZN32-DDAB: コレステロール(1:1)リポソーム複合体にエアロゾル曝露後48時間のマウス肺、及び未処理対照群のマウス肺の凍結切片の顕微鏡写真(異なる倍率で見た)を図11A~11Eに示す。ポリクローナル抗CFTR抗体 α -1468による強い染色で示されるように、気道の大筋は、ヒトCFTR遺伝子でトランスフェクトされていた。図11A、11C及び11Eを参照。目視で調べると、基本的にトランスフェクトされた気道の細胞すべてが陽性に染色されており、気道細胞の大多数が、単回エアロゾル投与量のDDAB-コレス

動物を注入後24時間で犠牲死させた。この組織抽出手順及びCATアッセイは、CATアッセイを3時間37℃でインキュベートし、2.0mMパラクソン(ライ(Lai), C.-C.ら, Carcinogenesis 9:1295-1302 (1988))を肝臓試料に添加した以外は、実施例12で記述されている通りであった。結果を図13に示す。レーン1~12は肺の試料、レーン13~24は肝臓の試料である。レーン1、2、13、14はpZN51; レーン3、4、15、16はpZN60; レーン5、6、17、18はpZN61; レーン7、8、19、20はpZN62; レーン9、10、21、22はpZN63; 及び、レーン11、12、23、24はpZN27である。pZN51はイントロンを含有せず、イントロンを含有するプラスミドと同様に、又はより発現する。

実施例11

CMV-CAT-リポソーム又はCFTR-CAT-リポソーム複合体各々の
静脈注入によってもたらされた
広汎的と組織及び細胞型特異的CAT遺伝子発現

マウス: 1CR、メス、25g

リポソーム: DDAB: Cho1=1:1 SUV、5%デキストロス水溶液中10mM

プラスミド: 1) pZN27又は、2) pBE3.8CAT (コンストラクションは、チョウら, J.Biol.Chem., 266:24471 1991 を参照)

手順: 3つの群のマウスは、1) 処理なし、又は、100 μ gの2) CAT遺伝子(pBE3.8CAT)に融合されたヒトCFTR遺伝子の5'上流領域の3.8kbと、若しくは3) pZN27と、複合されたDDAB: Cho1リポソームの単回尾静脈注入を受けた。マウスを24時間後に犠牲にし、CAT活性を肺、肝臓、脾臓、リンパ節、腎臓及び心臓において実施例12に記述されているようにアッセイした。各群からの肺切片の免疫組織学的解説を実施例11に記述されているように実施した。

テロール(1:1)リポソームに複合したpZN32で、in vivoにおいてヒトCFTR遺伝子によりトランスフェクトされることがわかる。代表的な切片を図11に示す。pZN32-DDAB: コレステロール(1:1)リポソーム処理動物のいずれでも、肺の損傷、炎症又は水腫の組織学的な証拠はなかった。pZN32-DDAB: コレステロール(1:1)リポソーム処理動物と対照動物とを組織学的に判別することはできなかった。ヒトCFTR遺伝子の有意な発現は、DDAB: コレステロール(1:1)リポソームに複合されたpZN32のエアロゾル単回投与を受けた後少なくとも60日たったマウスの群の気道全体の少なくとも50%、また気道管壁細胞全体の少なくとも50%で認められる(目視による)。対照群マウスの肺の凍結切片(図11B及び11D)からはCFTRについて検出可能な染色は示されず、図11A、11C及び11Eで認められるCFTR発現はすべてヒトCFTR遺伝子による肺細胞のトランスフェクションに起因するものであることが確認される。

実施例10

異なるCAT遺伝子含有プラスミドの静脈注入後の
肺及び肝臓におけるCAT遺伝子発現の証明

脂質キャリア:

DDAB: Cho1=1:1、5%デキストロス水溶液中10mMで保存。

プラスミド:

プラスミドは下記の示す。

DNA: 脂質キャリア比:

陽イオン性脂質: プラスミド=1nmol: 1 μ g

DNA投与量:

200 μ l 容積中100 μ g DNAを尾静脈から静脈内注入した。

マウス:

1CR、メス、25g

手順:

結果: 図14A-FのCATアッセイは、CMV-CATが、肺、肝臓、心臓、脾臓、リンパ節及び腎臓において有意なCAT遺伝子発現をもたらした。一方、CFTR-CATは肺特異的遺伝子発現をもたらしたことを証明した。従って、CMVプロモーターは広範囲の組織における連結遺伝子の発現を誘導し、一方、ヒトCFTR遺伝子の5'フラッキング領域はリポソーム主体投与後で組織特異性注入遺伝子発現を指向している。

これらのマウスからの凍結肺切片の免疫組織学的染色は、CMV-CAT-リポソーム複合体のiv注入が、肺内部の上皮肺胞及び気道細胞においてCAT遺伝子発現をもたらしたことを示した。対照的に、CFTR-CAT-リポソーム複合体は、気道上皮細胞において、まず、CAT遺伝子発現をもたらした。(これはin situ ハイブリダイゼーション研究によって決定されたラット肺における内因性CFTR遺伝子発現のパターンに近づく(トレザイズ(Trezise)とブッチワルド(Buchwald), Nature, 353:434, 1991))。これは、注入遺伝子がiv注入後で広汎性及び細胞型特異性様式のいずれかでマウス肺内部に発現することができることの最初の証明である。結果を図26A-Eに示す。

実施例12

エアロゾル投与後の陽イオン性リポソームに複合された注入遺伝子の
高レベル、肺特異性発現

動物:

すべての実験で、2カ月齢のメス1CRマウスを用いた。

プラスミドDNAの調製:

注入遺伝子発現レベルのレポーターとしては、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)を用いた(ゴルマンら, Proc. Nat'l Acad Sci (USA) (1982) 79:6777-6781)。使用したプラスミドには、ヒトサイトメガロウィルス(CMV)前初期プロモーター-エンハンサー要素(pCIS-CAT)に融合されたCAT遺伝子が含まれる。プラスミドは、アルカリ溶解及び酢酸アンモニウム沈殿(サンプラックら, (1989)、前出)を用いて精製し、260nmで紫外線吸収により核酸濃度を測定した。真核細胞にCAT遺伝子は存在しない。そ

の産物は、アセチル基がアセチルC o Aから基質クロラムフェニコールに移動すること触媒する酵素である。

陽イオン性脂質キャリア調製:

脂質キャリアは、陽イオン性脂質DOTMAをDOTMA:DOPE (モル比1:1)の形で含有する小さな単ラメラ小胞(直径約100nm)として調製された。DOTMAは{N-(1,2,3-ジオレイロキシ)プロピル}-N,N,N'-トリエチルアンモニウム(シンテックス・コーポレーション)、であり、DOPEは中性脂質ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン(アバンティ・ポーラー・リビド)である。脂質の原液をクロロホルムに溶解し、-20℃でアルゴン存在下で保存した。脂質を丸底フラスコ中で混合し、減圧下で回転蒸発器において蒸発乾燥させた。二重蒸留水を加えて、最終脂質濃度がそれぞれ10mMになるようにし、できあがった混合液を音波処理槽(ラボラトリー・サブライズ、ヒックスヴィル、ニューヨーク州)で約20分間音波処理した。リポソームは、使用するまで4℃でアルゴン存在下で保存した。

プラスミド/脂質キャリア複合体のマウスへのエアロゾル化送達:

24μmolのDOTMA:DOPE (モル比1:1)リポソームと12mgのプラスミドの複合体をエアロゾル化し、同一日の異なる時間に2回、マウスに投与した。逆に荷電している成分が凝集し、沈殿するのを防ぐために、プラスミドとリポソームは混合する前に滅菌水でそれぞれ別々に希釈された。プラスミドDNA 8mgとDOTMA:DOPE (1:1)リポソーム12μmolを、それぞれ水で8mlに希釈して混ぜた。それから2台のAcorn I 噴霧器(マルゲスト、イングルウッド、コロラド州)に4mlずつ入れ、動物をイントラノス小動物曝露チャンバ(アルバカーキ、ニューメキシコ州)に入れ、気流速4ℓ/分でエアロゾルを発生させた。4mlをエアロゾルにするのに約90分かかった。動物をチャンバから1~2時間で取り出し、その後もう一度同じ手順を2回目の4mlで繰り返した。

CAT活性の放射アッセイ:

エアロゾル曝露の1日後から2日後にCO₂チャンバ中で犠牲死させた動物から器官を摘出し、冷リン酸緩衝食塩水(PBS)で洗浄してから、ハンドヘル

ドの組織ホモジナイザーを使って、肺及び脾臓については5mMのEDTAを含有する250mMのトリス-HCl (pH7.5)で、肝臓、心臓及び腎臓については、5mMのEDTAに加えてプロテアーゼ阻害剤のアプロチニン、B-64、及びロイペプチン(ペーリンガー・マンハイム)を含有する250mMのトリス-HCl (pH7.5)でホモジナイズした。阻害剤は、アッセイ中に発生したアセチル化クロラムフェニコール種の分解を防ぎ、それによってCAT発現の最適検出を可能にする。

組織をホモジナイズした後で、細胞を凍結融解のサイクルを3回行って溶解し、溶解液を加熱して(65℃で10分間)、遠心分離した(16,000×g、2分間)。抽出物のタンパク質濃度を、クマジー・ブルーを主体とするアッセイ(バイオ・ラド)を使って測定した。タンパク質濃度を標準化した、抽出物の一部を100mMのアセチルC o A (シグマ)10μl、[1⁴C]標識化クロラムフェニコール(アマシャム)0.3μCiに加え、更に蒸留水を加えて最終的に180μlにし、37℃で8~10時間反応させた(ゴルマンら、(1982)、前出)。反応後、アセチル化及び非アセチル化クロラムフェニコールを冷酢酸エチルで抽出し、シリカTLCプレートに滴下し、クロロホルム:メタノール(85:5 v/v)溶媒で展開させた。そのTLCプレートを写真フィルム(コダック X-OMAT)に1~3日間露光し、その後、映像的に読み取った。

ゲノムDNAの調製及びサザンハイブリダイゼーション:

エアロゾル投与直後にマウスを犠牲死させて肝臓を取り出した。ゲノムDNAを単離し、ハイボンドN⁺メンブレン(アマシャム)を使ったサザンハイブリダイゼーション(サムブルックら、(1989)、前出)により解析した。ランダムプライムによりα-[³²P]dATPで標識化したCAT遺伝子の1.8kbのフラグメントから、CATプローブを調製した。これにより、約2×10⁸ dpm/μgの大体特異的なプローブを得た。ハイブリダイゼーション後、メンブレンを2×SSC、0.1% SDSで65℃で20分間洗浄し、24時間フィルムに露光した。トランスフェクトされたCAT遺伝子のコピー数の概数を求めるために、プロットを、マウス因子VII-Aゲノムクローンからの1.1kbのBSU36-1の単一コピープローブを用いて、ハイブリダイゼーションさせた(レビンソンら、Genomi

cs (1992) 13:862-865)。個々のマウスの肺に沈着したCATプラスミドの相対的な量を、分子ダイナミクス400Aリソ光撮影器を使ったリソ光撮影解析により定量した(ジョンソンら、Electrophoresis (1980) 1:355-360)。CATプローブでハイブリッド形成した後の各レーンにおける保持プローブ量を、因子VII-A単一コピープローブでハイブリダイゼーションした後に測定したカウントを使ってレーンあたりのDNA量に標準化した。

CAT酵素についてのin situ 免疫化学染色:

エアロゾル曝露後の一定の時点で、マウスを犠牲死させ、直ちに肺を取り出した。3%容重%のOC T(Niles, Inc)を含有するリン酸緩衝食塩水(PBS)を肺にゆっくりと浸透させ、OC Tで満たした組織カセットに配置し、ドライアイス/エタノール槽で冷却された2-メチルブタン中で凍結させた。凍結切片を5μmに切り、塩処理したスライド上に採取した。凍結切片を、0.1% Tween 20含有PBS (PBST)中の4%アセトン又は2%パラホルムアルデヒドで10分間固定してから、CATを検出した。その後の希釈及び洗浄もすべてPBST中で行った。

固定後、切片を3回洗浄(それぞれ5分間)してから、10%正常ウサギ血清で20℃で10分間置いた。血清を、CATに対する希釈(1:500)ウサギポリクローナル抗体(パーカー・アンチン(Parker Antin)博士及びデビッド・スタンディング(David Standring)博士、UCSFメディカル・センター)に置き換えた。抗体で覆った切片に更にシリコン化カバースライドをそっと載せ、4℃24時間湿潤チャンバにおいてインキュベートした。その後スライドを20℃まで加熱し、3回洗浄した。1:300に希釈されたビオチン化アフィニティ精製抗ウサギ抗体(ベクター・ラボラトリー)で1時間、切片を覆い、その後洗浄して(10分ずつ3回)、アルカリホスファターゼで標識化したストレプトアビジン(ザイメッド、南サンフランシスコ)で20分間置換して、CATに対するウサギ抗体との結合の有無を調べた。内在アルカリホスファターゼはレバミゾール(ザイメッド)で阻止されることによって、AP-レッド(ザイメッド)を色素源として用いて固定化したアルカリホスファターゼを検出した。ストレプトアビジン複合体の細気管支上皮細胞に対する疑似粘着可能性を制御するために、一部の切片は一次抗体を

適用する前に遊離アビジン及びビオチンで処理した。この他に同時に行った制御処置としては、一次抗体の代わりに正常ウサギ血清を使うこと並びに、未処理マウスからの肺組織を使うことが含まれる。コダック・エクタクロム 64Tフィルム X50 (図6A、D)及びX250 (図8B、C、E、F)を使って、顕微鏡写真を撮った。

結果

最初、マウスをCMV-CAT発現プラスミド12mgのみを含有する溶液から生成したエアロゾル、及びDOTMA:DOPE (1:1)リポソーム24μmolに結合したCMV-CAT 12mgを含む溶液から生成したエアロゾルのいずれかに曝露した。動物を1匹ずつ鼻先が出る円錐体に入れてから、イントラノス小動物曝露チャンバに入れた後、エアロゾルを施した。エアロゾル曝露実施中及びその後のいずれでも、マウスに悪影響や呼吸困難は見られなかった。図7に、エアロゾル実施後72時間で犠牲死させたマウスの肺抽出物について行ったCATアッセイの結果を示す。有意なCAT遺伝子発現が見られたのは、エアロゾル化したDNA/脂質キャリア複合体に曝露したマウスだけであった。

CATタンパク質がどのくらいの間マウスの肺に存在したか、またレポーター遺伝子の発現は肺に限定されたのかどうかについても調べた。動物間で差はあるものの、DNA/脂質キャリア複合体のエアロゾル単回投与の遅くとも21日後には、高レベルのCAT活性が認められる(図24A)。肺で高レベルの発現が示された動物の心臓、脾臓、腎臓又は肝臓の抽出物ではCAT活性は検出されなかった(図24B)。これは、エアロゾル送達後の注入遺伝子発現が肺に限定されることを示唆している。この結果は、正常動物の呼吸器上皮を通じてきわめて高分子の物質の浸透がかなり制限されるというこれまでの観察結果と一致するものである。プラスミドDNA/脂質キャリア複合体の分子量は、10⁶ダルトンよりも大きい。

これらの実験で用いられた小動物曝露チャンバは、48匹までの各動物に均一なエアロゾル投与を効率よく行うことができるようになっているが、1回の実験のうちでも、マウスの肺におけるCAT活性レベルに有意な差があることがわか

っている。このばらつきの説明として考えられるのは、マウスの肺に沈着するDNA/リボソーム複合体の量が均一ではないということである。この仮説を検定するために、蛍光分析を使ってリボソームの初期肺沈着量を測定し、またサザンブロット分析を使ってDNAの初期肺沈着量を測定した。

0.5 モル%の蛍光標識した脂質（ローダミン-フォスファチジルエタノールアミン）を含有しているエアロゾル化陽イオン性リボソーム単独若しくはDNA/リボソーム単独又はDNA/リボソーム複合体を、マウスに投与した。エアロゾル投与直後に動物を犠牲死させ、その肺を摘出し、ホモジナイズして、蛍光分析装置を使ってローダミン蛍光を測定した。動物1匹あたりの蛍光回収率は、投与エアロゾル総量の0.06%±0.02 (SD) であった。これは1回の実験でエアロゾル化されたDNA 12mg 中、実際に肺に沈着したのは10μg未満であることを示唆する。更に、リボソームのみを受けた動物と、DNA/リボソーム複合体を受けた動物の間での脂質沈着に有意差はなかった。噴霧中に複合体の破壊が起こる可能性があるため、エアロゾル化中に沈着したCAT遺伝子の量も評価した（図25）。DNA/脂質キャリア複合体のエアロゾル送達直後にマウスを犠牲死させ、全肺DNAを調製した。α³²P標識化CAT遺伝子で、サザンブロットをプローブした。標識化バンドを走査し、同一実験中の動物間におけるプラスミド沈着の差は4倍未満であった（図25）。これらの結果から、エアロゾル化送達後のCAT遺伝子レベルにおける個体間のばらつき（最高10倍）は、肺に最初に沈着した複合体の量の作用だけではなく、取込み部位の違い、肺クリアランス速度、及び/又は様々な肺細胞型の注入遺伝子発現能力の差などを反映していることが示唆された。

in vivo でトランスフェクトされた肺細胞の型と割合を調べるために、DNA/リボソーム複合体含有エアロゾルに曝露して72時間後に犠牲死させたマウスの肺を凍結切片化して、ポリクローナル抗CAT抗体でプローブし、対比染色して細胞内CATタンパク質を検出した（図22）。DNA/脂質キャリア処理マウスの肺切片では、細気管支及び肺胞成分にまで拡散した免疫染色パターンが認められた。細気管支上皮細胞質が最も強く、且つ不均一に染色された。調べた気道のほぼすべてにおいてCAT抗原が検出され（赤色染色により実証）、染色され

ていないのはごく一部の細胞もしくは2〜3細胞クラスターだけであった（図22A、22B）。拡散肺胞パターンは、肺胞管壁細胞の大多数が中等度の染色を示していたことによる（図22C）。これらの領域は時としてぼやけて小さくなり、管壁細胞の染色がわずかな場所が、ランダムに散らばっていた。拡散している個々の肺胞管壁細胞の細胞質では、集中的な強度の染色（図中の矢印）が見られた（図22C）。一次抗体の代わりに正常ウサギ血清を使ったもの（図22D）及び未処理動物の肺切片を用いたもの（図22E、22F）を対照とした。免疫染色はいずれの対照調製物でも検出できなかった。処理群と対照群のマウスの肺の複数切片を検討したが、エアロゾル処理の副作用を示唆するような有意な病変は見られなかった。

上記の結果から、対象遺伝子を含有し、陽イオン性リボソームと複合されたエアロゾル単回投与量の発現リボソームは、導入部気管及び肺の肺胞の両方の内壁を覆う細胞の大部分をトランスフェクトすること、該遺伝子産物は少なくとも60日間肺に存在すること、その発現は肺特異性であること、また曝露後に損傷を示す組織学的証拠はないことがわかる。従って、エアロゾル化した陽イオン性リボソームは、分裂細胞でも非分裂細胞でも有効なトランスフェクションを伸介する。多くの気道上皮細胞は十分に分化し、ゆっくりと分裂し、又は全くしないため、この点は重要なことである。脂質キャリアは、十分に寛容であり且つ非免疫原性のものである。更に、エアロゾル化及び注入のいずれかのpZNS2:DDAB-コレステロール（1:1）複合体で処理されたマウスの外見、挙動及び寿命は、正常であり、未処理、正常の対照動物と区別がつかず、これは、これらのキャリアコンストラクトの毒性及び哺乳動物におけるヒトCFTR遺伝子の過剰発現が無いことを証明している。その上、DNA/リボソーム複合体の反復エアロゾル投与の効果は有効且つ無毒である。エアロゾルによる陽イオン性リボソーム伸介DNA送達は、in vivo で高レベルの肺特異的な注入遺伝子発現をもたらす。

個々の論文及び特許出願を特別にまた個別に援用して本文の一部としているように、全ての論文や特許出願を援用して本文の一部とする。

本発明についての十分な説明はこれで完了するが、添付のクレームの精神及び範囲から逸脱することなく、本発明に多くの変更と改良を施すことができることは、当業者にとって明かであろう。

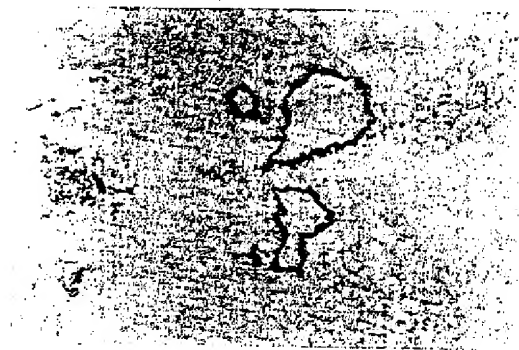


FIGURE 1A

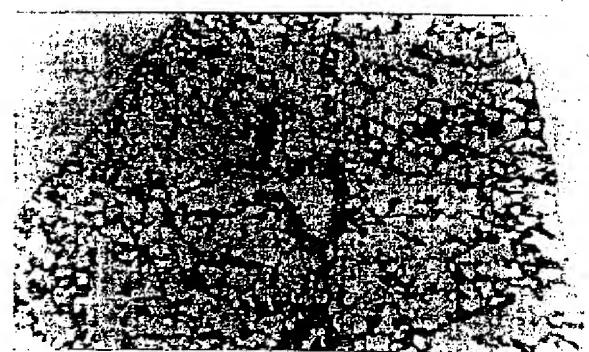


FIGURE 1B

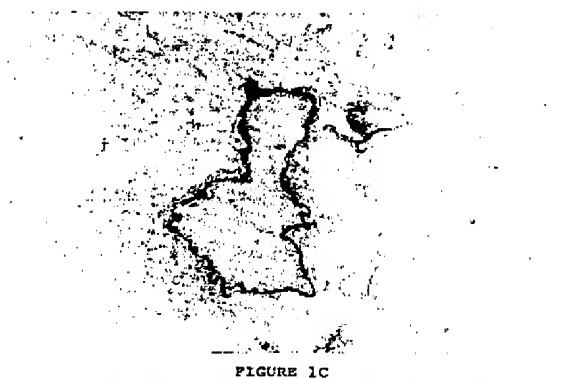


FIGURE 1C

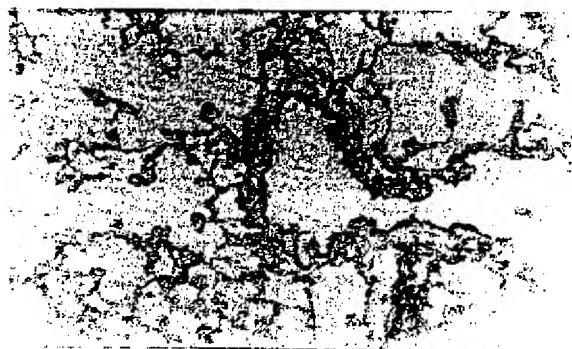


FIGURE 1D

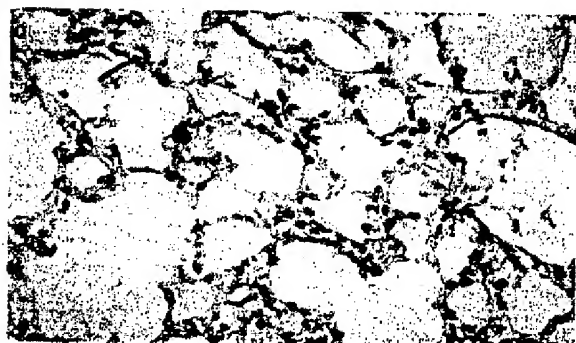


FIGURE 2A

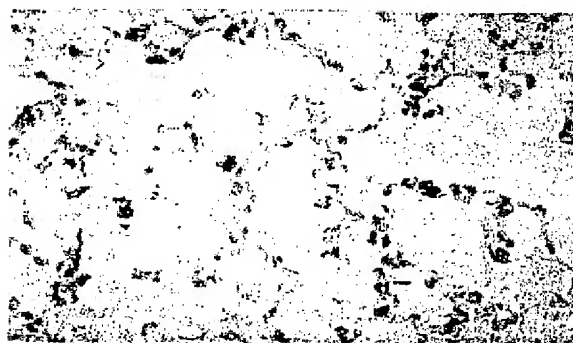


FIGURE 2B



FIGURE 1E

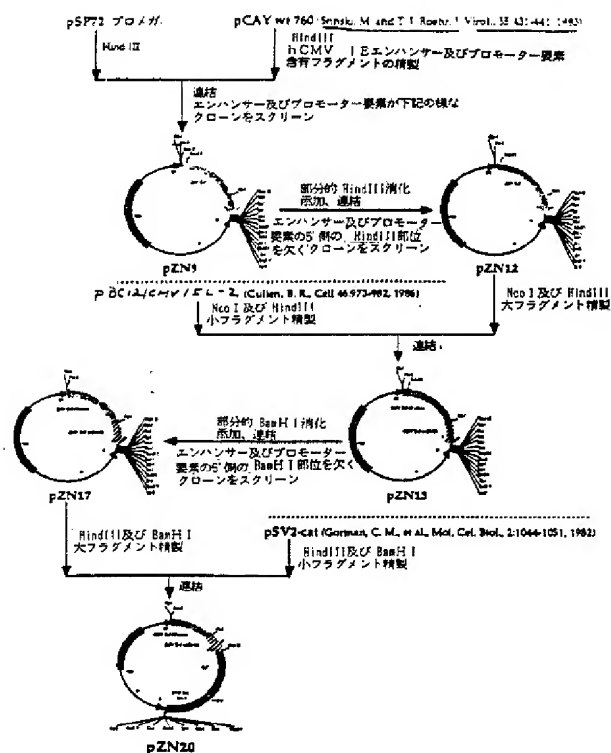


Fig. 3



FIGURE 4

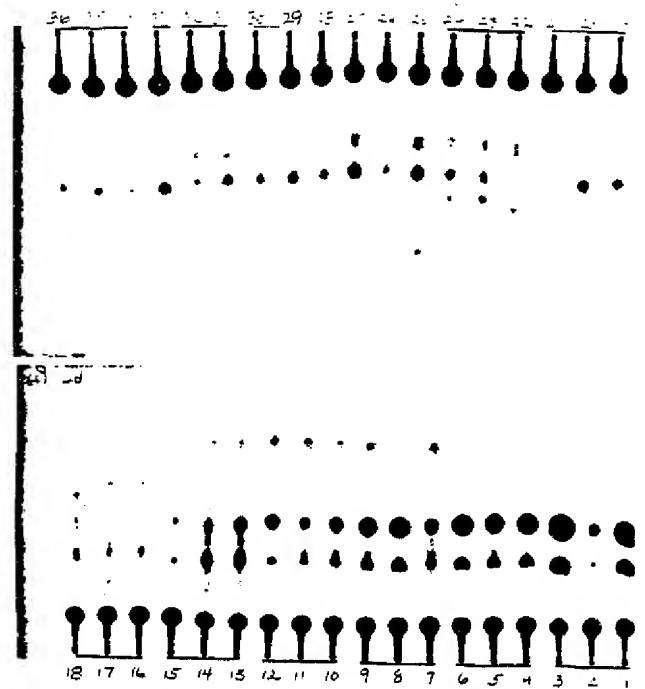


FIGURE 5

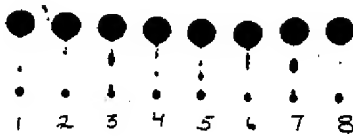


FIGURE 9A



FIGURE 6

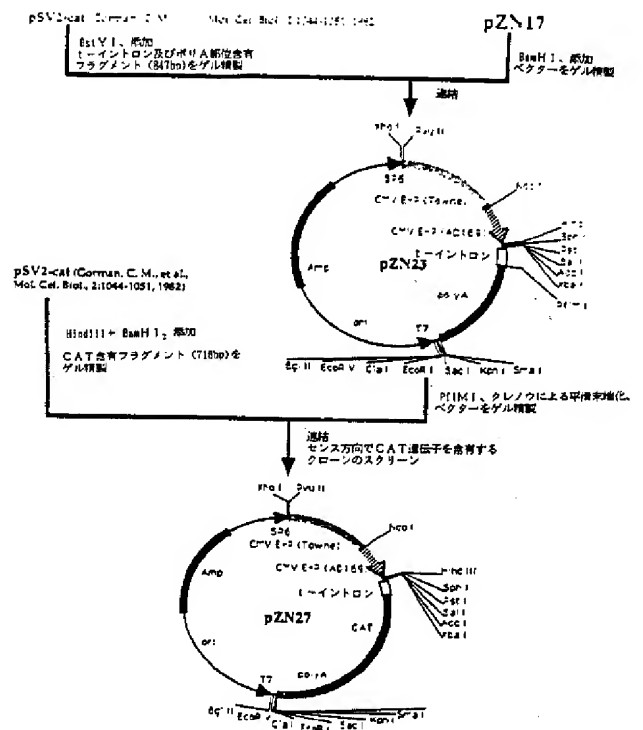


Fig. 7

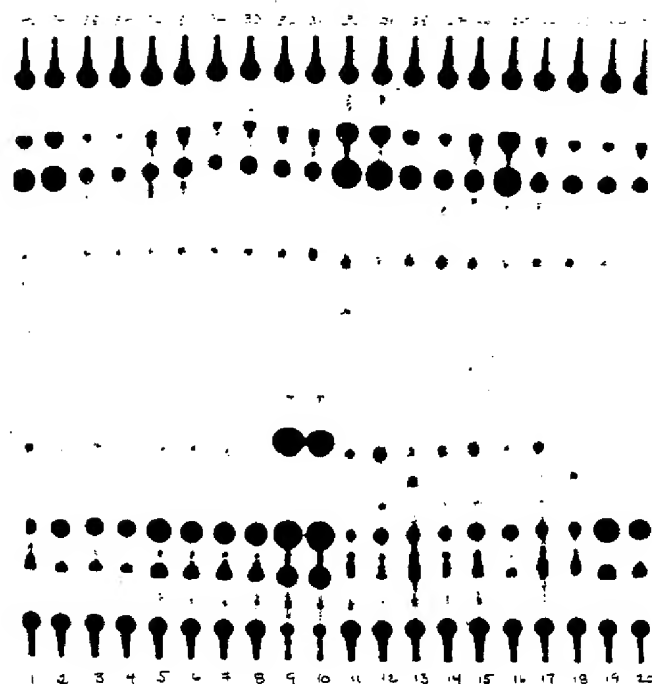


FIGURE 8A

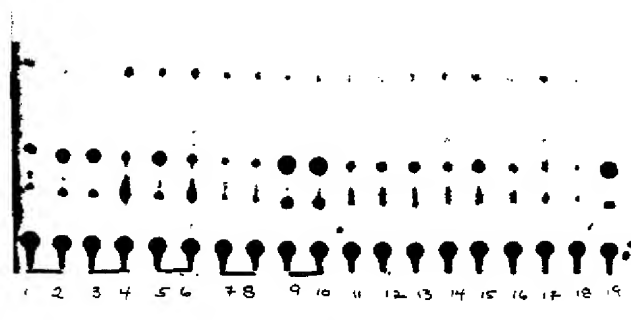


FIGURE 8B



FIGURE 9

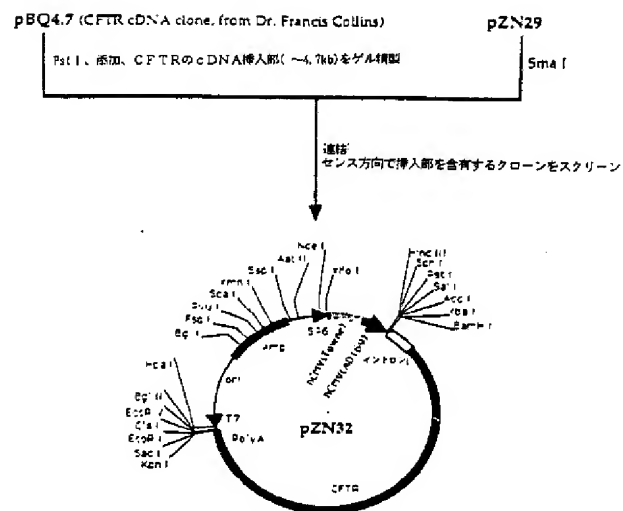
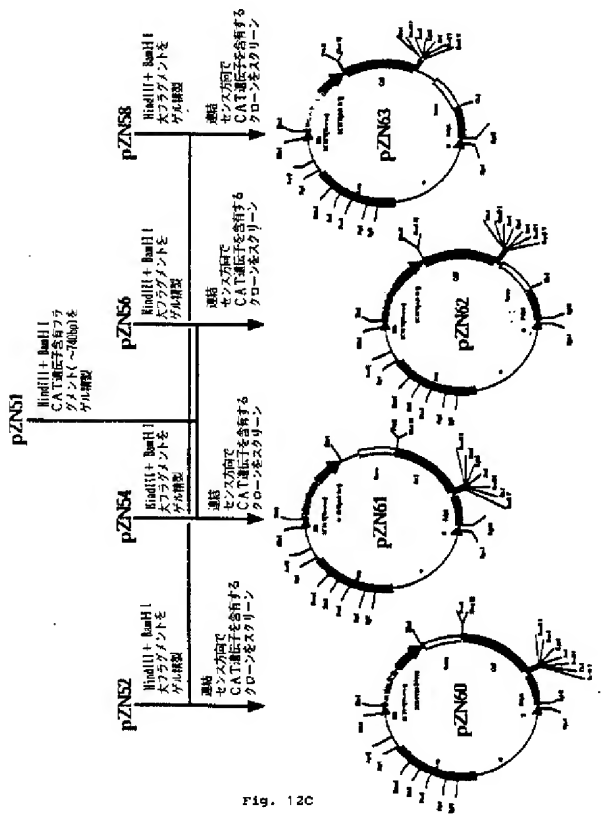
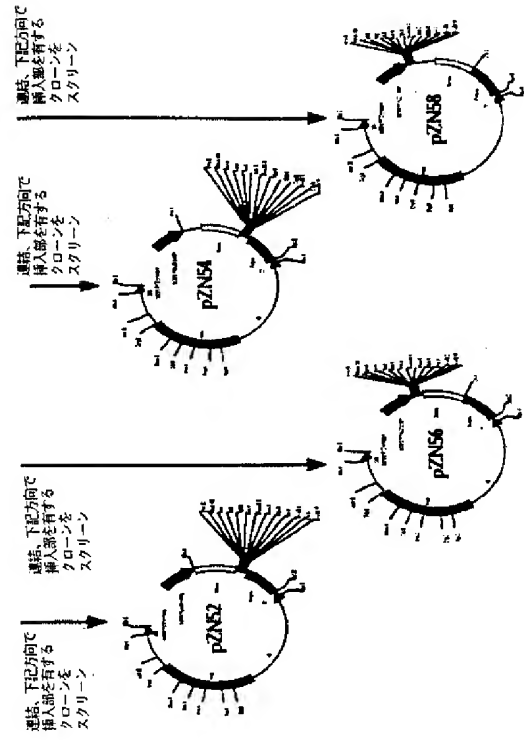
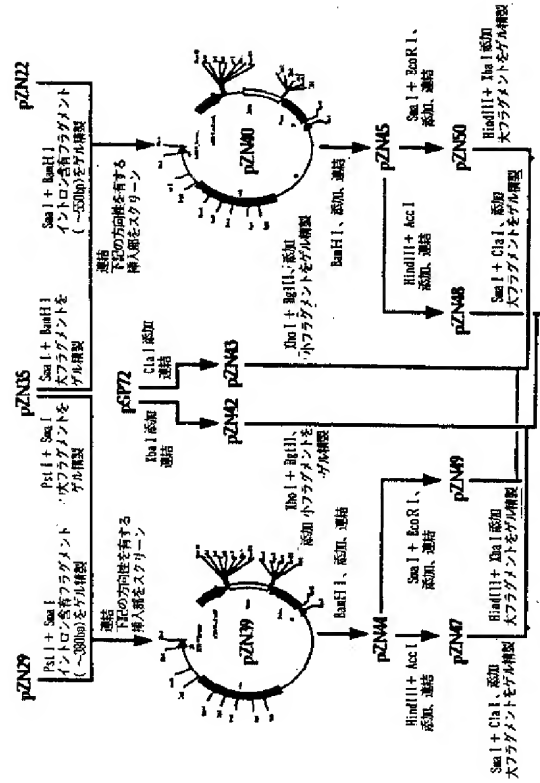
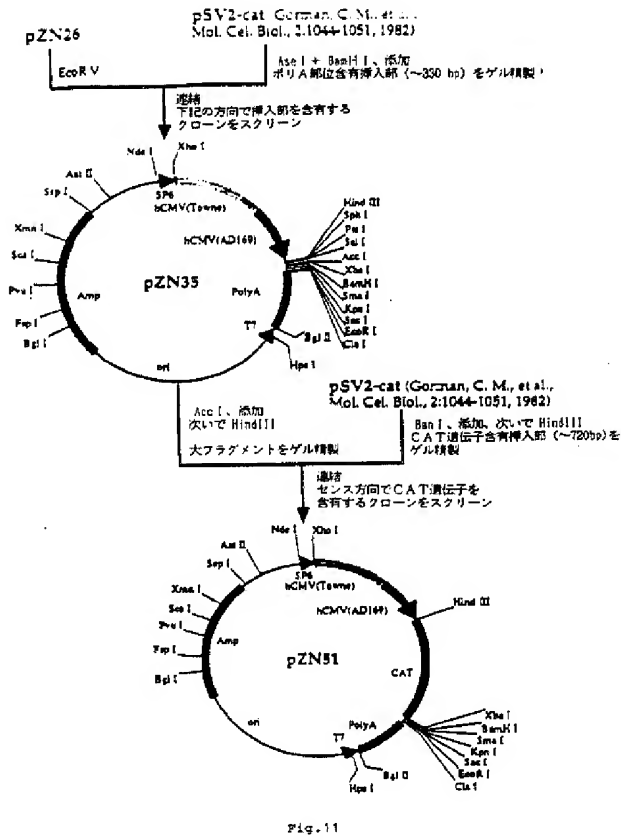


Fig. 10



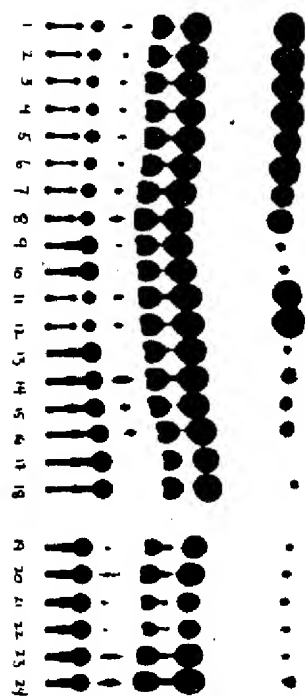


FIGURE 13

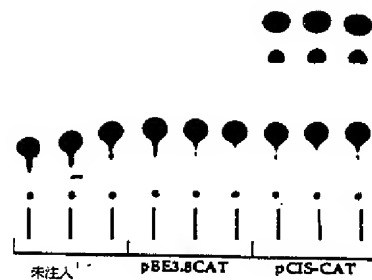


FIGURE 14A

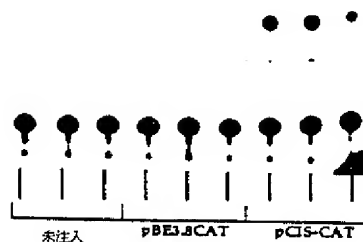


Fig. 14B

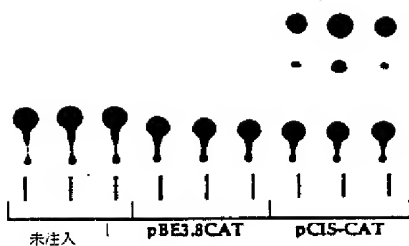


FIGURE 14C

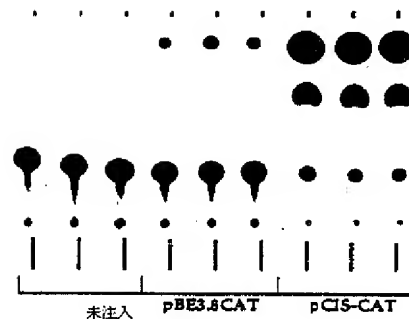


FIGURE 14E

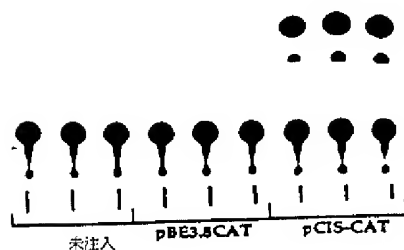


Fig. 14D

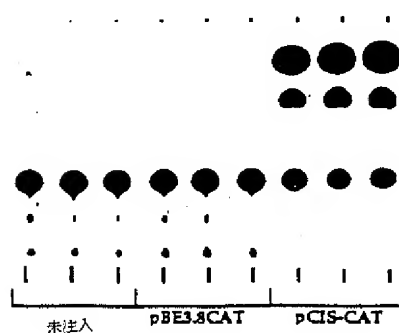


Fig. 14F

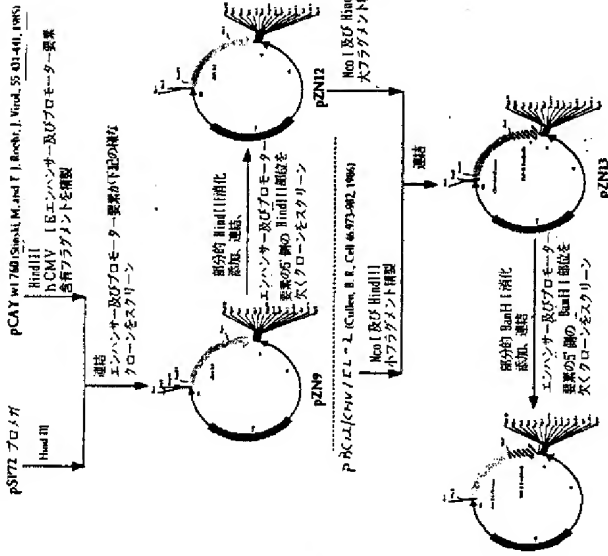


Fig. 15

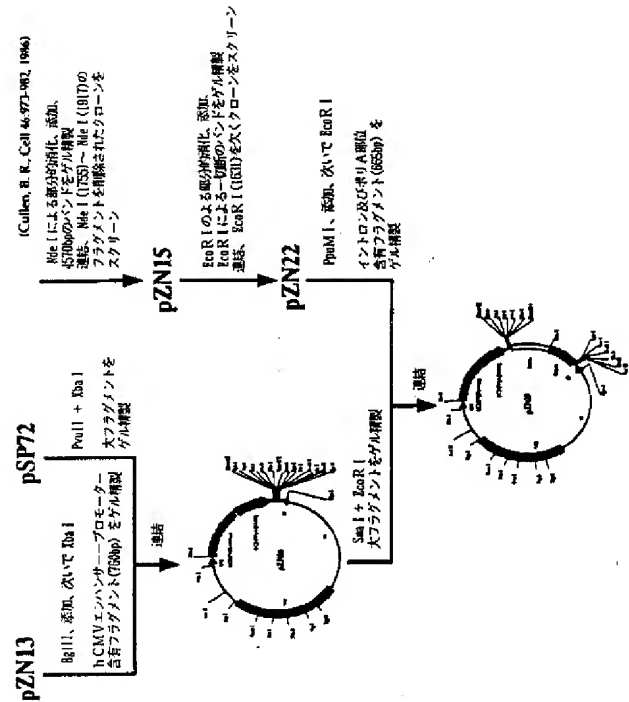


Fig. 16

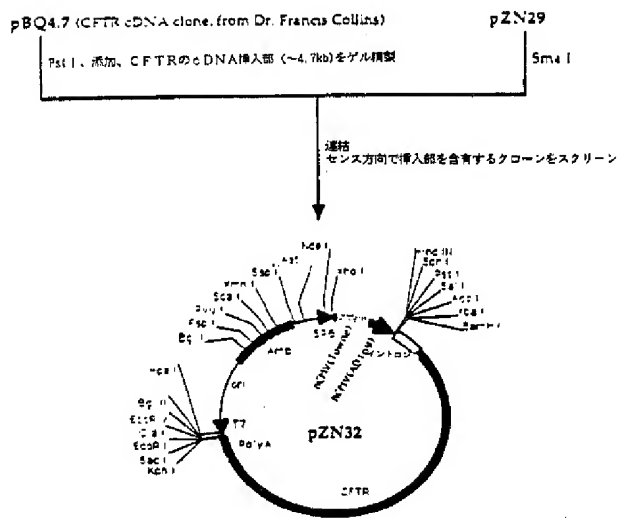


Fig. 17

PDF GENERATED BY 1. 1992年3月3日(火), 7:25:33 PM

HCMV (Totale) → 完全制限地図

DNA配列 414 b.p. GGTTCGACCCGTCCTCA ... AGTCGACGTCAGGTC 直線

制限エンドヌクレアーゼ部位の位置（固有部位に下線）：

Mar II
 Apr II
 May II
 Jun II
 Jul II
 Aug II
 Sep II
 Oct II
 Nov II
 Dec II
 Jan III
 Feb III
 Mar III
 Apr III
 May III
 Jun III
 Jul III
 Aug III
 Sep III
 Oct III
 Nov III
 Dec III
 Jan IV
 Feb IV
 Mar IV
 Apr IV
 May IV
 Jun IV
 Jul IV
 Aug IV
 Sep IV
 Oct IV
 Nov IV
 Dec IV
 Jan V
 Feb V
 Mar V
 Apr V
 May V
 Jun V
 Jul V
 Aug V
 Sep V
 Oct V
 Nov V
 Dec V
 Jan VI
 Feb VI
 Mar VI
 Apr VI
 May VI
 Jun VI
 Jul VI
 Aug VI
 Sep VI
 Oct VI
 Nov VI
 Dec VI
 Jan VII
 Feb VII
 Mar VII
 Apr VII
 May VII
 Jun VII
 Jul VII
 Aug VII
 Sep VII
 Oct VII
 Nov VII
 Dec VII
 Jan VIII
 Feb VIII
 Mar VIII
 Apr VIII
 May VIII
 Jun VIII
 Jul VIII
 Aug VIII
 Sep VIII
 Oct VIII
 Nov VIII
 Dec VIII
 Jan IX
 Feb IX
 Mar IX
 Apr IX
 May IX
 Jun IX
 Jul IX
 Aug IX
 Sep IX
 Oct IX
 Nov IX
 Dec IX
 Jan X
 Feb X
 Mar X
 Apr X
 May X
 Jun X
 Jul X
 Aug X
 Sep X
 Oct X
 Nov X
 Dec X
 Jan XI
 Feb XI
 Mar XI
 Apr XI
 May XI
 Jun XI
 Jul XI
 Aug XI
 Sep XI
 Oct XI
 Nov XI
 Dec XI
 Jan XII
 Feb XII
 Mar XII
 Apr XII
 May XII
 Jun XII
 Jul XII
 Aug XII
 Sep XII
 Oct XII
 Nov XII
 Dec XII
 Jan XIII
 Feb XIII
 Mar XIII
 Apr XIII
 May XIII
 Jun XIII
 Jul XIII
 Aug XIII
 Sep XIII
 Oct XIII
 Nov XIII
 Dec XIII
 Jan XIV
 Feb XIV
 Mar XIV
 Apr XIV
 May XIV
 Jun XIV
 Jul XIV
 Aug XIV
 Sep XIV
 Oct XIV
 Nov XIV
 Dec XIV
 Jan XV
 Feb XV
 Mar XV
 Apr XV
 May XV
 Jun XV
 Jul XV
 Aug XV
 Sep XV
 Oct XV
 Nov XV
 Dec XV
 Jan XVI
 Feb XVI
 Mar XVI
 Apr XVI
 May XVI
 Jun XVI
 Jul XVI
 Aug XVI
 Sep XVI
 Oct XVI
 Nov XVI
 Dec XVI
 Jan XVII
 Feb XVII
 Mar XVII
 Apr XVII
 May XVII
 Jun XVII
 Jul XVII
 Aug XVII
 Sep XVII
 Oct XVII
 Nov XVII
 Dec XVII
 Jan XVIII
 Feb XVIII
 Mar XVIII
 Apr XVIII
 May XVIII
 Jun XVIII
 Jul XVIII
 Aug XVIII
 Sep XVIII
 Oct XVIII
 Nov XVIII
 Dec XVIII
 Jan XIX
 Feb XIX
 Mar XIX
 Apr XIX
 May XIX
 Jun XIX
 Jul XIX
 Aug XIX
 Sep XIX
 Oct XIX
 Nov XIX
 Dec XIX
 Jan XX
 Feb XX
 Mar XX
 Apr XX
 May XX
 Jun XX
 Jul XX
 Aug XX
 Sep XX
 Oct XX
 Nov XX
 Dec XX
 Jan XXI
 Feb XXI
 Mar XXI
 Apr XXI
 May XXI
 Jun XXI
 Jul XXI
 Aug XXI
 Sep XXI
 Oct XXI
 Nov XXI
 Dec XXI
 Jan XXII
 Feb XXII
 Mar XXII
 Apr XXII
 May XXII
 Jun XXII
 Jul XXII
 Aug XXII
 Sep XXII
 Oct XXII
 Nov XXII
 Dec XXII
 Jan XXIII
 Feb XXIII
 Mar XXIII
 Apr XXIII
 May XXIII
 Jun XXIII
 Jul XXIII
 Aug XXIII
 Sep XXIII
 Oct XXIII
 Nov XXIII
 Dec XXIII
 Jan XXIV
 Feb XXIV
 Mar XXIV
 Apr XXIV
 May XXIV
 Jun XXIV
 Jul XXIV
 Aug XXIV
 Sep XXIV
 Oct XXIV
 Nov XXIV
 Dec XXIV
 Jan XXV
 Feb XXV
 Mar XXV
 Apr XXV
 May XXV
 Jun XXV
 Jul XXV
 Aug XXV
 Sep XXV
 Oct XXV
 Nov XXV
 Dec XXV
 Jan XXVI
 Feb XXVI
 Mar XXVI
 Apr XXVI
 May XXVI
 Jun XXVI
 Jul XXVI
 Aug XXVI
 Sep XXVI
 Oct XXVI
 Nov XXVI
 Dec XXVI
 Jan XXVII
 Feb XXVII
 Mar XXVII
 Apr XXVII
 May XXVII
 Jun XXVII
 Jul XXVII
 Aug XXVII
 Sep XXVII
 Oct XXVII
 Nov XXVII
 Dec XXVII
 Jan XXVIII
 Feb XXVIII
 Mar XXVIII
 Apr XXVIII
 May XXVIII
 Jun XXVIII
 Jul XXVIII
 Aug XXVIII
 Sep XXVIII
 Oct XXVIII
 Nov XXVIII
 Dec XXVIII
 Jan XXIX
 Feb XXIX
 Mar XXIX
 Apr XXIX
 May XXIX
 Jun XXIX
 Jul XXIX
 Aug XXIX
 Sep XXIX
 Oct XXIX
 Nov XXIX
 Dec XXIX
 Jan XXX
 Feb XXX
 Mar XXX
 Apr XXX
 May XXX
 Jun XXX
 Jul XXX
 Aug XXX
 Sep XXX
 Oct XXX
 Nov XXX
 Dec XXX
 Jan XXXI
 Feb XXXI
 Mar XXXI
 Apr XXXI
 May XXXI
 Jun XXXI
 Jul XXXI
 Aug XXXI
 Sep XXXI
 Oct XXXI
 Nov XXXI
 Dec XXXI
 Jan XXXII
 Feb XXXII
 Mar XXXII
 Apr XXXII
 May XXXII
 Jun XXXII
 Jul XXXII
 Aug XXXII
 Sep XXXII
 Oct XXXII
 Nov XXXII
 Dec XXXII
 Jan XXXIII
 Feb XXXIII
 Mar XXXIII
 Apr XXXIII
 May XXXIII
 Jun XXXIII
 Jul XXXIII
 Aug XXXIII
 Sep XXXIII
 Oct XXXIII
 Nov XXXIII
 Dec XXXIII
 Jan XXXIV
 Feb XXXIV
 Mar XXXIV
 Apr XXXIV
 May XXXIV
 Jun XXXIV
 Jul XXXIV
 Aug XXXIV
 Sep XXXIV
 Oct XXXIV
 Nov XXXIV
 Dec XXXIV
 Jan XXXV
 Feb XXXV
 Mar XXXV
 Apr XXXV
 May XXXV
 Jun XXXV
 Jul XXXV
 Aug XXXV
 Sep XXXV
 Oct XXXV
 Nov XXXV
 Dec XXXV
 Jan XXXVI
 Feb XXXVI
 Mar XXXVI
 Apr XXXVI
 May XXXVI
 Jun XXXVI
 Jul XXXVI
 Aug XXXVI
 Sep XXXVI
 Oct XXXVI
 Nov XXXVI
 Dec XXXVI
 Jan XXXVII
 Feb XXXVII
 Mar XXXVII
 Apr XXXVII
 May XXXVII
 Jun XXXVII
 Jul XXXVII
 Aug XXXVII
 Sep XXXVII
 Oct XXXVII
 Nov XXXVII
 Dec XXXVII
 Jan XXXVIII
 Feb XXXVIII
 Mar XXXVIII
 Apr XXXVIII
 May XXXVIII
 Jun XXXVIII
 Jul XXXVIII
 Aug XXXVIII
 Sep XXXVIII
 Oct XXXVIII
 Nov XXXVIII
 Dec XXXVIII
 Jan XXXIX
 Feb XXXIX
 Mar XXXIX
 Apr XXXIX
 May XXXIX
 Jun XXXIX
 Jul XXXIX
 Aug XXXIX
 Sep XXXIX
 Oct XXXIX
 Nov XXXIX
 Dec XXXIX
 Jan XL
 Feb XL
 Mar XL
 Apr XL
 May XL
 Jun XL
 Jul XL
 Aug XL
 Sep XL
 Oct XL
 Nov XL
 Dec XL
 Jan XLI
 Feb XLI
 Mar XLI
 Apr XLI
 May XLI
 Jun XLI
 Jul XLI
 Aug XLI
 Sep XLI
 Oct XLI
 Nov XLI
 Dec XLI
 Jan XLII
 Feb XLII
 Mar XLII
 Apr XLII
 May XLII
 Jun XLII
 Jul XLII
 Aug XLII
 Sep XLII
 Oct XLII
 Nov XLII
 Dec XLII
 Jan XLIII
 Feb XLIII
 Mar XLIII
 Apr XLIII
 May XLIII
 Jun XLIII
 Jul XLIII
 Aug XLIII
 Sep XLIII
 Oct XLIII
 Nov XLIII
 Dec XLIII
 Jan XLIV
 Feb XLIV
 Mar XLIV
 Apr XLIV
 May XLIV
 Jun XLIV
 Jul XLIV
 Aug XLIV
 Sep XLIV
 Oct XLIV
 Nov XLIV
 Dec XLIV
 Jan XLV
 Feb XLV
 Mar XLV
 Apr XLV
 May XLV
 Jun XLV
 Jul XLV
 Aug XLV
 Sep XLV
 Oct XLV
 Nov XLV
 Dec XLV
 Jan XLVI
 Feb XLVI
 Mar XLVI
 Apr XLVI
 May XLVI
 Jun XLVI
 Jul XLVI
 Aug XLVI
 Sep XLVI
 Oct XLVI
 Nov XLVI
 Dec XLVI
 Jan XLVII
 Feb XLVII
 Mar XLVII
 Apr XLVII
 May XLVII
 Jun XLVII
 Jul XLVII
 Aug XLVII
 Sep XLVII
 Oct XLVII
 Nov XLVII
 Dec XLVII
 Jan XLVIII
 Feb XLVIII
 Mar XLVIII
 Apr XLVIII
 May XLVIII
 Jun XLVIII
 Jul XLVIII
 Aug XLVIII
 Sep XLVIII
 Oct XLVIII
 Nov XLVIII
 Dec XLVIII
 Jan XLIX
 Feb XLIX
 Mar XLIX
 Apr XLIX
 May XLIX
 Jun XLIX
 Jul XLIX
 Aug XLIX
 Sep XLIX
 Oct XLIX
 Nov XLIX
 Dec XLIX
 Jan L
 Feb L
 Mar L
 Apr L
 May L
 Jun L
 Jul L
 Aug L
 Sep L
 Oct L
 Nov L
 Dec L
 Jan LI
 Feb LI
 Mar LI
 Apr LI
 May LI
 Jun LI
 Jul LI
 Aug LI
 Sep LI
 Oct LI
 Nov LI
 Dec LI
 Jan LII
 Feb LII
 Mar LII
 Apr LII
 May LII
 Jun LII
 Jul LII
 Aug LII
 Sep LII
 Oct LII
 Nov LII
 Dec LII
 Jan LIII
 Feb LIII
 Mar LIII
 Apr LIII
 May LIII
 Jun LIII
 Jul LIII
 Aug LIII
 Sep LIII
 Oct LIII
 Nov LIII
 Dec LIII
 Jan LIV
 Feb LIV
 Mar LIV
 Apr LIV

Fig. 19A(1)

Fig. 19B(2)

Fig. 19C(1)

Fig. 19B(3)

Fig. 19C(2)



Fig. 19C(3)



FIGURE 20

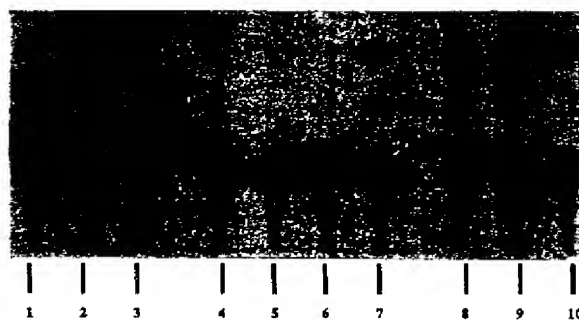


FIGURE 21

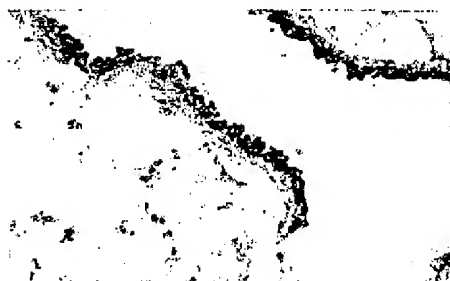


FIGURE 22A



FIGURE 22C



FIGURE 22B

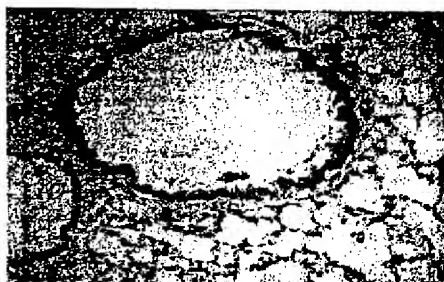


FIGURE 22D

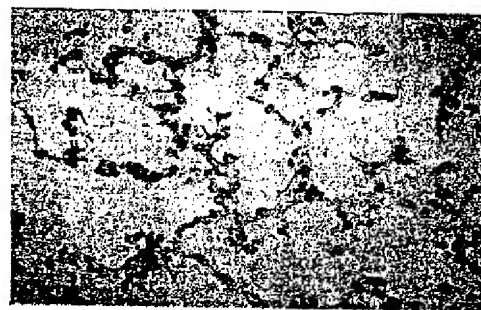


FIGURE 22F



FIGURE 22E

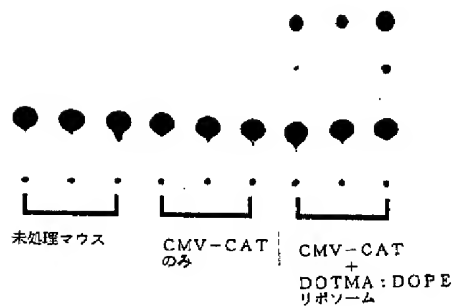


Fig. 23

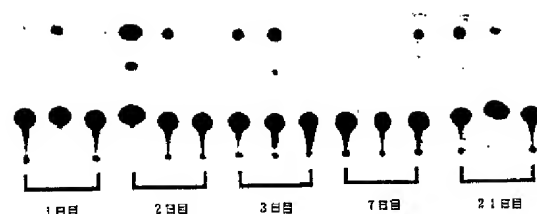


FIGURE 24A

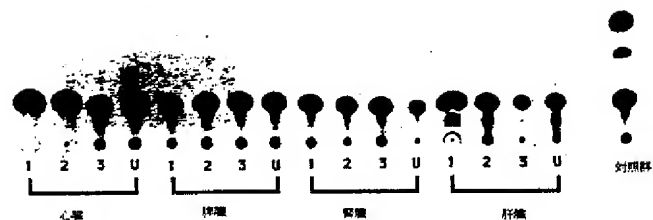


Fig. 24B

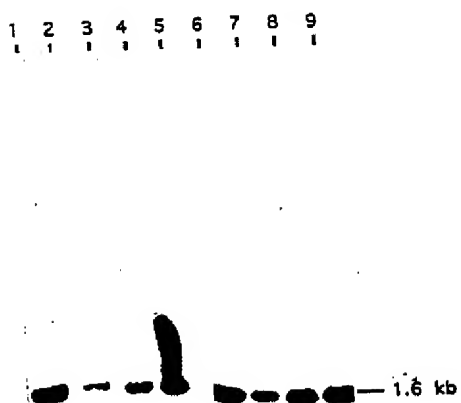


FIGURE 25

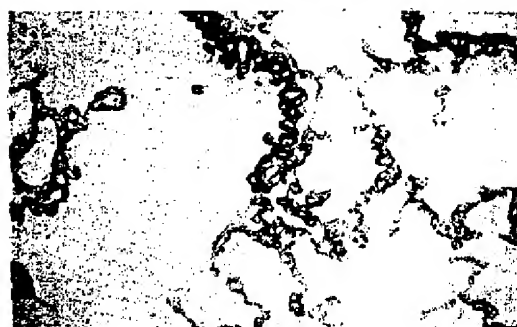


FIGURE 26A

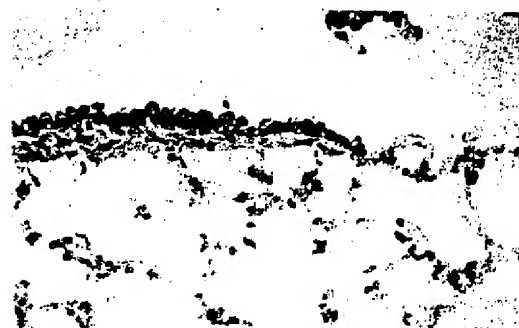


FIGURE 26B



FIGURE 26C



FIGURE 26D



FIGURE 26E

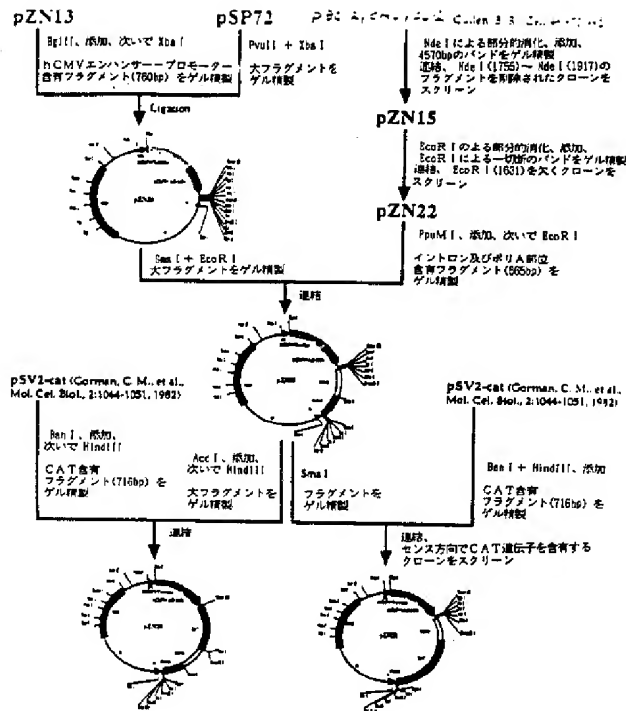


Fig. 27A

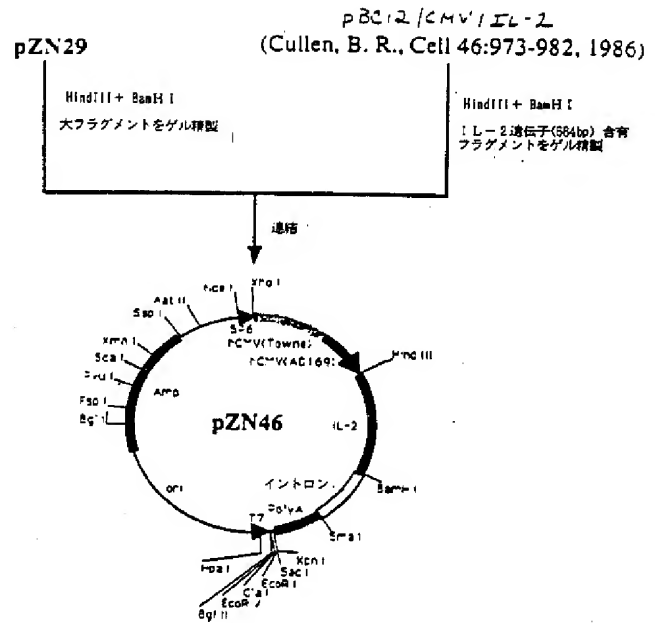


Fig. 27B

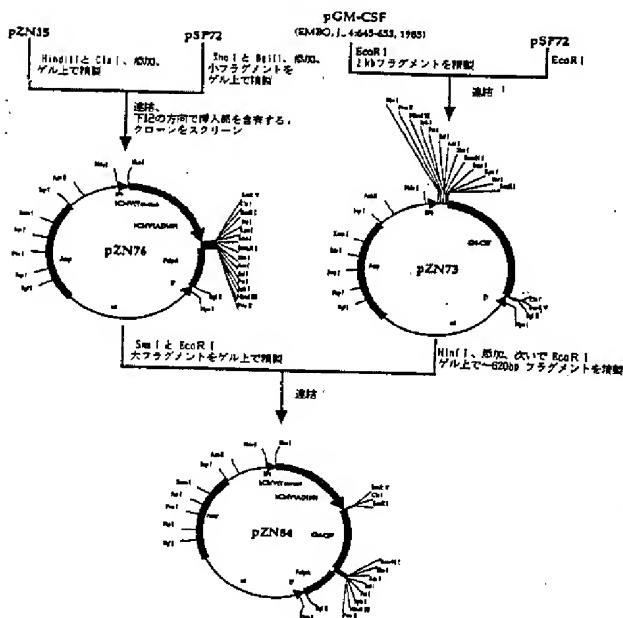


Fig. 2BA

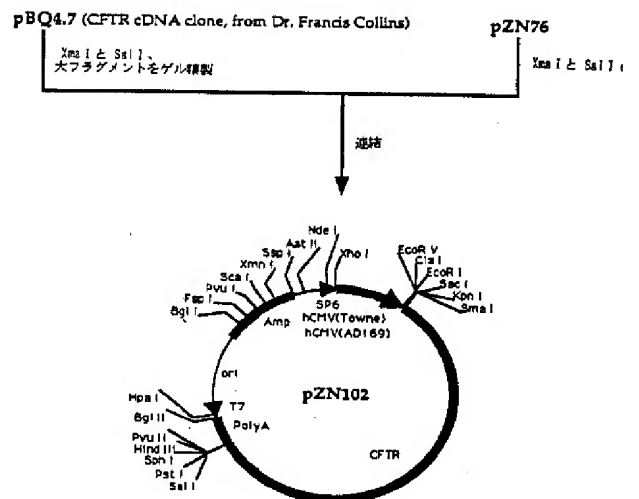


Fig. 28B

國際調查報告

International Application No. PCT/US 92/11004

1. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classifications apply, indicate all)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both International Classification and IPC		
Int. Cl. 5 C12N15/88;	A61K48/00;	C12N15/12;
A61K47/48		
2. FIELD OF SEARCH		
Minimum Documentation Searched		
Classification System	Classification System	
Int. Cl. 5	A61K ;	C12N ; C07K
Documentation Searched other than Minimum Documentation		
In the Cases that such Documents are Indicated by the Field Searched		
3. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Character of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No.
P, X	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 89, no. 23, 1 December 1992, WASHINGTON US, pages 11277 - 11281 STRIBLING, R. ET AL. 'Aerosol gene delivery in vivo' see the whole document ---	1-28
P, Y	CELL, vol. 58, no. 1, 10 January 1992, CAMBRIDGE, MA US, pages 143 - 158 ROSENFELD, M.A. ET AL. 'In vivo transfer of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene to the airway epithelium' see the whole document ---	1-28
P, X	CELL, vol. 58, no. 1, 10 January 1992, CAMBRIDGE, MA US, pages 143 - 158 ROSENFELD, M.A. ET AL. 'In vivo transfer of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene to the airway epithelium' see the whole document ---	1, 2, 5, 17, 22, 24, 25, 28
P, Y	CELL, vol. 58, no. 1, 10 January 1992, CAMBRIDGE, MA US, pages 143 - 158 ROSENFELD, M.A. ET AL. 'In vivo transfer of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene to the airway epithelium' see the whole document ---	1-28
* Symbols characterizing the documents: "A" documents relating to the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "X" documents relating to the prior art which is not considered to be of particular relevance "Y" documents relating to the prior art which is not considered to be of particular relevance "P" documents relating to the prior art which is not considered to be of particular relevance "C" documents relating to the prior art which is not considered to be of particular relevance "D" documents relating to the prior art which is not considered to be of particular relevance "E" documents relating to the prior art which is not considered to be of particular relevance "F" documents relating to the prior art which is not considered to be of particular relevance "G" documents relating to the prior art which is not considered to be of particular relevance "H" documents relating to the prior art which is not considered to be of particular relevance "I" documents relating to the prior art which is not considered to be of particular relevance "J" documents relating to the prior art which is not considered to be of particular relevance "K" documents relating to the prior art which is not considered to be of particular relevance "L" documents relating to the prior art which is not considered to be of particular relevance "M" documents relating to the prior art which is not considered to be of particular relevance "N" documents relating to the prior art which is not considered to be of particular relevance "O" documents relating to the prior art which is not considered to be of particular relevance "P" documents relating to the prior art which is not considered to be of particular relevance "Q" documents relating to the prior art which is not considered to be of particular relevance "R" documents relating to the prior art which is not considered to be of particular relevance "S" documents relating to the prior art which is not considered to be of particular relevance "T" documents relating to the prior art which is not considered to be of particular relevance "U" documents relating to the prior art which is not considered to be of particular relevance "V" documents relating to the prior art which is not considered to be of particular relevance "W" documents relating to the prior art which is not considered to be of particular relevance "X" documents relating to the prior art which is not considered to be of particular relevance "Y" documents relating to the prior art which is not considered to be of particular relevance "Z" documents relating to the prior art which is not considered to be of particular relevance		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Search Completion of the International Search	Date of Mailing of the International Search Report	
29 APRIL 1993	29 APR 93	
International Searching Authority	Signature of Authorized Official	
EUROPEAN PATENT OFFICE	CHAMBERNET F.J.	

Form PCT/ISA(81) (Amended January 1988)

RE. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category *	Character of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No.
P, X	NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 20, no. 12, June 1992, ARLINGTON, VIRGINIA US, pages 3233 - 3240 YOSHIMURA, K. ET AL. 'Expression of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in the mouse lung after in vivo intratracheal plasmid-mediated gene transfer' cited in the application see the whole document ---	1, 2, 5, 17, 24, 25, 28
P, Y	EP, A.0 446 017 (GENZYME CORPORATION) 11 September 1991 cited in the application see page 21, line 28 - page 22, line 2 see page 25, line 8 - line 15; claims 3-10, 16, 17 see the whole document ---	1-28
X	EP, A.0 446 017 (GENZYME CORPORATION) 11 September 1991 cited in the application see page 21, line 28 - page 22, line 2 see page 25, line 8 - line 15; claims 3-10, 16, 17 see the whole document ---	1, 2, 17, 24, 25, 28
Y	WO, A.9 102 796 (HSC RESEARCH DEVELOPMENT CORPORATION) 7 March 1991 see claims 90-92 ---	1-28
X	WO, A.9 102 796 (HSC RESEARCH DEVELOPMENT CORPORATION) 7 March 1991 see claims 90-92 ---	1, 7, 8
P, X	WO, A.9 205 273 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN) 2 April 1992 see page 17, line 30 - page 18, line 2 see page 18, line 28 - line 35; claims see the whole document ---	1-3, 17, 21, 28
P, Y	WO, A.9 205 273 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN) 2 April 1992 see page 17, line 30 - page 18, line 2 see page 18, line 28 - line 35; claims see the whole document ---	1-28
Y	US, A.5 049 386 (EPPSTEIN, D.A., FELGNER, P. L., THOMAS, R.G., JONES, G.H., RICHARD, B.) 17 September 1991 see column 9, line 9 see column 10, line 43 - line 58 see column 11, line 42 - line 53 see column 13, line 13 - line 17 ---	1-28
Y	JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 140, no. 10, 15 May 1988, BALTIMORE US, pages 3482 - 3488 DESS, R.J. ET AL. 'Lung-specific delivery of cytokines induces sustained pulmonary and systemic immunomodulation in rats' see the whole document ---	1-28

Form PCT/ISA(81) (Amended January 1988)

國際調查報告

US 9211004
SA 69296

This search report (the "search report") is a preliminary report on the results of the search conducted by the International Searching Authority (ISA) in response to the international application (the "application") filed with the ISA on 29/04/93.

The search was conducted in accordance with the provisions of the Patent Cooperation Treaty (PCT) and the Rules and Regulations thereunder.

The search was conducted in the following fields of search: 29/04/93

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family identifier(s)	Publication date
EP-A-0446017	11-09-91	None	
WO-A-9102796	07-03-91	AU-A- 6161650 CA-A- 2066204 EP-A- 0489058 JP-T- 5500306	03-04-91 23-02-91 10-06-92 28-01-93
WO-A-9205273	02-04-92	None	
US-A-5049386	17-09-91	US-A- 4897355 US-A- 4946787 AU-B- 594654 AJ-A- 5185386 EP-A, B 0187702 JP-A- 61161246	10-01-90 07-08-90 15-03-90 17-07-86 16-07-86 21-07-86

For more details about this search, see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/92

フロントページの続き

(31)優先権主張番号 927, 200
 (32)優先日 1992年8月6日
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 972, 135
 (32)優先日 1992年11月5日
 (33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, SN, TD, TG), AT, AU, BB, BG, BR, CA, CH, CS, DE, DK, ES, FI, GB, HU, JP, K P, KR, LK, LU, MG, MN, MW, NO, PL, RO, RU, SD, SE, US
 (72)発明者 ツー、ニン
 アメリカ合衆国 94116 カリフォルニア
 州 サンフランシスコ セブンティーンス
 アベニュー 2137